



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIO DEL REPLEGAMIENTO IN VITRO DE LA PROTEÍNA VP1 DEL  
PARVOVIRUS B19V

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
IRIS ASHANTY SOTO VALERIO

TUTOR PRINCIPAL  
Dr. ISMAEL BUSTOS JAIMES  
[Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco  
[Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina](#)  
Dr. Luis Fernando Olguín Contreras  
[Departamento de Físicoquímica de la Facultad de Química](#)  
Dr. Ismael Bustos Jaimes  
[Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina](#)

Ciudad de México. Junio, 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Jurado Asignado:

Presidente: Garza Ramos Martínez Georgina Regina

Vocal: González Andrade Martín

Vocal: Hernández García Armando

Vocal: Arreguín Espinosa de los Monteros Roberto

Secretario: González Segura Lilián

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

AGRADEZCO AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA  
(CONACyT) POR LA BECA OTORGADA DURANTE MIS ESTUDIOS DE  
MAESTRÍA.

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

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

Quiero ofrecer un especial agradecimiento a la C.D. María José Gómora Herrera por el apoyo brindado durante la experimentación con líneas celulares y en la posterior etapa de visualización mediante microscopia confocal.

Y al Dr. Javier Esteban Jiménez Salazar por el tiempo otorgado al mantenimiento y cuidado de los cultivos celulares.

Agradecimiento a la Dra. Cristina Castañeda por su apoyo en la realización de los inmunoensayos realizados en este trabajo.



Dedicado a mi Familia  
Gracias por el apoyo, paciencia y amor otorgados

## Agradecimientos

Quiero agradecer especialmente al Dr. Ismael Bustos Jaimes por la oportunidad que me otorgo al permitirme volver a trabajar bajo su tutela en este gran proyecto, el cual nos brindó grandes satisfactores. Además, agradecerle infinitamente el apoyo brindado, sobre todo en los momentos de mayor vulnerabilidad por las situaciones recientemente vividas.

Al Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco y al Dr. Luis Fernando Olguín Contreras los cuales me brindaron los consejos y la orientación adecuada para ayudar a concretar este proyecto.

A todos los miembros del jurado por las observaciones y contribuciones que ayudaron a enriquecer este trabajo.

A la Dra. Georgina Garza Ramos Martínez por su arduo trabajo y compromiso para con el laboratorio. Por su entusiasmo y apoyo durante el proyecto.

A la Dra. Maribel Cayetano Cruz por sus consejos y apoyo incondicional durante el desarrollo de este trabajo. Y por la gran amistad que surgió en este tiempo.

Al M. en C. Hugo César Santillán Uribe por su paciencia y apoyo para ayudarme a comprender el mundo de las VLPs, por las pláticas inspiradoras de nuevas hipótesis y por su cuidado y valiosa amistad.

A la M.C Josefina Valadez García por sus horas frente al microscopio, su paciencia, sus muy interesantes pláticas y su gran amistad.

A mis compañeros y amigos del grupo de trabajo: Carmen, Carlos, Carla, Lolita, Jorge, Sac Nicté, Willy, Javier, Lourdes e Ignacio. Con ustedes se compartieron largas jornadas que fueron mas amenas por su compañía.

A mis compañeros y amigos del LFQIP: Daniel, Ricardo, Fátima, Sergio S., Esaú, Yasel, Alejandra, Manuel, Saira, Aaron, Hugo L., Sergio. R., Jesús B., Diego, Renán, Eloy, Karla, Cinthya, Eréndira, Alex. Gracias por las horas de trabajo, las pláticas, los consejos, las comidas y demás horas de convivencia. Gracias por su valiosa amistad.

A mis amistades de siempre y a las que se sumaron durante esta etapa: Nadia, Nelly, Blanca, Ilse, Gilda, Luz, Isamar, Andrea, Arón, Maat, Manu, Toño, Eduardo, Ana, Hilda, Itzel, Dany L., Lupita, Arturo, Brayán, Bere, Adri, y aquellos que me falten. Muchas gracias por su hermosa amistad.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN.</b> ....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN.</b> .....	<b>2</b>
ERITROPARVOVIRUS I DE PRIMATE (B19V).....	2
INTERACCIONES DEL B19V CON LAS CÉLULAS BLANCO. ....	5
ACTIVIDAD DE FOSFOLIPASA A2 (PLA <sub>2</sub> ) EN EL PARVOVIRUS B19V. ....	15
NANO-ACARREADORES.....	19
SISTEMA SPYTAG-SPYCATCHER. ....	20
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.</b> .....	<b>23</b>
<b>HIPÓTESIS.</b> .....	<b>23</b>
<b>OBJETIVOS.</b> .....	<b>24</b>
GENERAL. ....	24
PARTICULARES. ....	24
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.</b> .....	<b>25</b>
ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO: .....	25
MATERIALES. ....	26
<i>Material Biológico</i> .....	26
<i>Reactivos Químicos</i> .....	26
<i>Amortiguadores</i> .....	27
<i>Instrumentos y Equipos</i> .....	28
METODOLOGÍA .....	30
<i>Análisis in silico de la VP1u para la obtención de un modelo tridimensional.</i> .....	30
<i>Transformación de células de E. coli DH10B para la propagación del plásmido pET22b-VP16H.</i> .....	30
<i>Purificación del plásmido por mini-prep.</i> .....	31
<i>Caracterización del vector pET22b-VP16H mediante digestión del plásmido.</i> .....	31
<i>Transformación de células E. coli BL21(DE3) electo-competentes.</i> .....	32
<i>Inducción de la expresión de la proteína VP1.</i> .....	33
<i>Limpieza de los cuerpos de inclusión.</i> .....	34
<i>Purificación de la proteína VP1 mediante cromatografía de afinidad a Níquel.</i> .....	35
<i>Determinación de la concentración de la proteína.</i> .....	36
<i>Ensamble de proteínas para la obtención de VLPs.</i> .....	37
<i>Caracterización de VLPs mediante DLS.</i> .....	37
<i>Purificación de VLPs mediante cromatografía de exclusión molecular.</i> .....	38
<i>Caracterización de VLPs mediante ultra-centrifugación isopícnica</i> .....	38
<i>Caracterización de VLPs por microscopía de fuerza atómica (AFM).</i> .....	39
<i>Caracterización de VLPs mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM).</i> .....	40
<i>Determinación de la actividad catalítica de PLA<sub>2</sub> perteneciente a VP1u mediante cromatografía en placa fina (TLC).</i> .....	41
<i>Determinación de la hemólisis generada en RBC por acción de la PLA<sub>2</sub> de VP1.</i> .....	41
<i>Co-ensamble de VLPs con las proteínas VP1: VP2: ST-VP2.</i> .....	43
<i>Funcionalización de las VLPs mediante el sistema SpyTag/SpyCatcher.</i> .....	44
<i>Caracterización de VLPs funcionalizadas con sGFP-SC por microscopía de fuerza atómica (AFM).</i> .....	45

<i>Ensayos de unión e internalización celular en hepatocitos (línea celular HepG2)</i> .....	45
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b> .....	<b>47</b>
<i>Análisis in silico de la VP1u para la obtención de un modelo tridimensional.</i> .....	47
.....	49
<i>Transformación, purificación y digestión enzimática del plásmido pET22b-VP16H.</i> .....	55
<i>Transformación de células de E. coli BL21(DE3) e inducción de la expresión.</i> .....	56
<i>Purificación de VP1 y VP2.</i> .....	57
<i>Caracterización de VLPs mediante DLS.</i> .....	59
<i>Caracterización de VLPs mediante cromatografía de exclusión molecular.</i> .....	61
<i>Caracterización de VLPs mediante ultra-centrifugación isopícnica.</i> .....	64
<i>Caracterización de VLPs mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) y microscopía de transmisión electrónica (TEM).</i> .....	67
<i>Determinación de la actividad catalítica de PLA<sub>2</sub> perteneciente a VP1u mediante cromatografía en placa fina (TLC).</i> .....	70
<i>Actividad hemolítica de PLA<sub>2</sub> de VP1 en RBC.</i> .....	72
<i>Co-ensamble de VLPs con ST-VP2:VP2:VP1.</i> .....	73
<i>Funcionalización de las VLPs mediante el sistema SpyTag/SpyCatcher.</i> .....	78
<i>Caracterización de VLPs funcionalizadas con sfGFP-SC por microscopía de fuerza atómica (AFM).</i> ....	79
<i>Ensayos de unión e internalización de VLPs con ST-VP2:VP2:VP1 funcionalizadas con sfGFP-SC en células HepG2.</i> .....	80
<b>CONCLUSIONES.</b> .....	<b>83</b>
<b>PERSPECTIVAS.</b> .....	<b>84</b>
<b>REFERENCIAS.</b> .....	<b>85</b>

## RESUMEN.

Las VLPs son cápsides virales idénticas a los viriones nativos sin contener material genético, conservando sus características intrínsecas como el tamaño, tropismo celular y antigenicidad. Las VLPs tienen diversas aplicaciones, entre las que destacan su capacidad para la generación de vacunas, su efectividad para transportar moléculas bioactivas, y su eficiencia en la entrega de dichas moléculas a tejidos específicos.

El parvovirus B19 (B19V) es de interés biotecnológico para la generación de VLPs funcionalizadas. Las cápsides del B19V son icosaédricas, con diámetro de 20-25 nm, y están compuestas de 60 subunidades proteicas, de las cuales la proteína VP2 aporta el 95% del total de la cápside y la proteína VP1 el 5% restante. Ambas proteínas difieren únicamente en 227 aminoácidos, presentes en el extremo N-terminal de la proteína minoritaria VP1, a esta región se le ha denominado región única de VP1 o simplemente VP1u. La proteína VP2 tiene capacidad de auto ensamblarse generando VLPs, tanto *in vivo* como *in vitro*, situación que la proteína VP1 no logra realizar eficazmente *in vivo*.

Se sabe que la proteína minoritaria VP1 es crítica para el correcto tropismo e internalización celular. El mecanismo por el cual VP1 concede la entrada a las células aun no se logra dilucidar completamente. No obstante, se sabe que VP1u presenta un dominio de unión a receptor, el cual promueve un cambio conformacional en la VP1u al interactuar con su receptor (aún desconocido), exponiendo el siguiente motivo, conformado por el tripéptido (RGE), el cual interactúa con la integrina  $\alpha 5\beta 1$ . Esta integrina está involucrada directamente en la internalización de los viriones a las células blanco. La región VP1u presenta actividad intrínseca de fosfolipasa tipo 2, que se expone después del primer contacto con el receptor y facilita la liberación de los viriones del lisosoma.

En este trabajo se exploró la formación *in vitro* de VLPs a partir de VP1. Nuestros resultados demuestran que VP1, por sí sola, forma VLPs, y además se puede co-ensamblar con VP2 en diferentes proporciones. Se evaluó el correcto plegamiento de VP1u por su actividad de fosfolipasa, y por su capacidad de promover la internalización de VLPs de B19V en células HepG2 (hepatocarcinoma), encontrando en ambos casos que VP1u es funcional. Este trabajo provee información relevante sobre VP1 y amplía el abanico de posibilidades de funcionalización de las VLPs de B19V, para que puedan ser aplicadas como plataforma novedosa en terapias sitio específicas para el tratamiento de enfermedades hepáticas.

## INTRODUCCIÓN.

### *Eritroparvovirus I de primate (B19V).*

El Eritroparvovirus I de primate, generalmente conocido como parvovirus B19 (B19V), es parte de la familia Parvoviridae y se clasifica dentro del género de los *Erytrovirus* [1,2]. Esta familia incluye virus cuyo cromosoma consiste en una cadena sencilla de ADN lineal, encapsulada en cápsides icosaédricas de entre 20 y 25 nm de diámetro. El B19V infecta principalmente a niños y adolescentes en edad escolar (5 a 14 años), provocando el llamado eritema infeccioso. Además, casusa poliartropatía en adultos, crisis agudas de aplasia en pacientes con anemia hemolítica crónica, y anemia crónica en pacientes con inmunosupresión. Durante el embarazo, adicionalmente, el virus puede provocar hidropesía fetal con la posible muerte del producto. La infección por B19V se transmite principalmente por vía respiratoria [1, 2, 3]. La producción de anticuerpos IgM comienza a los 12 días de infección y persisten por aproximadamente 3 meses. Los anticuerpos específicos IgG aparecen varios días después de la producción de IgM y permanecen de por vida protegiendo al individuo de subsecuentes infecciones [4].

La cápside del B19V está compuesta por 60 copias de dos proteínas estructurales: VP1 y VP2. La proteína VP1 cuenta con 781 residuos de aminoácidos (AA.) con un peso molecular de 83 kDa, constituye el 5% de la masa total de la cápside y está directamente asociada a la interacción celular; mientras que la proteína VP2 consta de 554 AA. (58 kDa), aporta el 95% restante de la cápside y se asocia al reconocimiento antigénico mediado por IgM. Ambas proteínas son idénticas, a excepción de una región adicional de 227 AA. en el extremo N-terminal de VP1, conocida como “región única de VP1” (VP1u). La parte estructural de ambas proteínas es la región VP, formada por un barril beta con ocho hebras beta conectadas por asas proyectadas al exterior de la cápside, las cuales determinan la topografía y estructura específica de este virus. Debido a la frecuencia tan pequeña de VP1 en la cápside, la estructura de VP1u es aún desconocida [1, 2, 3, 4].

Las cápsides de diferentes parvovirus son similares en tamaño y estructura, y por tanto en las características de sus superficies, por lo que comparten algunas de las interacciones moleculares con las células hospederas [5,6,7,8]. La Figura 1 muestra el modelo cristalográfico de la cápside del B19V (PDB 1s58) comparado con las estructuras cristalográficas del virus adeno-asociado (AAV-2), PDB 6ih9; el parvovirus diminuto de ratón (MVM), PDB 4zpy; y el parvovirus felino (FPV), PDB 1c8e.

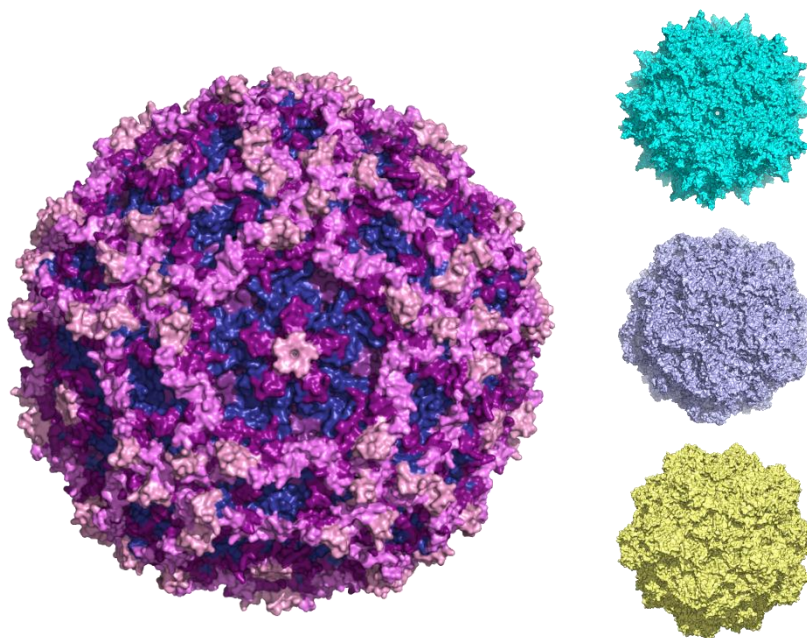


Fig.1 Comparación del modelo de la cápside del parvovirus B19 PDB 1s58 contra las cápsides de los parvovirus AAV-2 PDB 6ih9 (cian), FPV PDB 1c8e (lila) y MVM PDB 4zpy (amarillo).

Todas las cápsides de los parvovirus están compuestas por subunidades proteicas que presentan un barril  $\beta$  sumamente conservado, y regiones hipervariables (asas) conectadas a las ocho hebras del barril  $\beta$  (Fig. 2) [1, 3, 5]. Estas asas son precisamente las que confieren diferencias topológicas a las cápsides de los parvovirus, aportando a cada uno receptores celulares y grado de antigenicidad específicos [3]. En el modelo cristalográfico de la cápside del parvovirus B19 (Fig. 1), reportado por Kaufmann en 2004, se logró dilucidar la densidad electrónica de la mayor parte de la proteína estructural VP2, con excepción de 13 residuos (301-313) que forman una de las asas con mayor movilidad, ubicada cerca al eje de simetría de orden 3, y la densidad de 18 aminoácidos del extremo N-terminal. Esto último suele ocurrir con algunas estructuras cristalográficas de otros parvovirus, probablemente porque su posición varía en cada monómero [5, 9].

En la Figura 2 se observa un análisis de conservación del modelo cristalográfico de la proteína estructural VP2 del B19V contra proteínas estructurales de otros parvovirus [10, 11]. Es clara la alta conservación del barril  $\beta$ , como se ha reportado para diferentes parvovirus como el AAV-2 y el MVM [9]. Se observa además la conservación de algunos segmentos de las asas (*loops*) que forman el eje de simetría de orden 3: las asas 3 y 4 del segmento GH, el asa 1 del segmento BC y otra porción del segmento GH; regiones que tanto en el B19V como en otros parvovirus podrían estar fuertemente asociadas al ensamble de las cápsides o

formar parte de los dominios de unión a receptores celulares, lo que justamente en el B19V se sugiere ocurre en las protuberancias generadas en este eje de simetría.

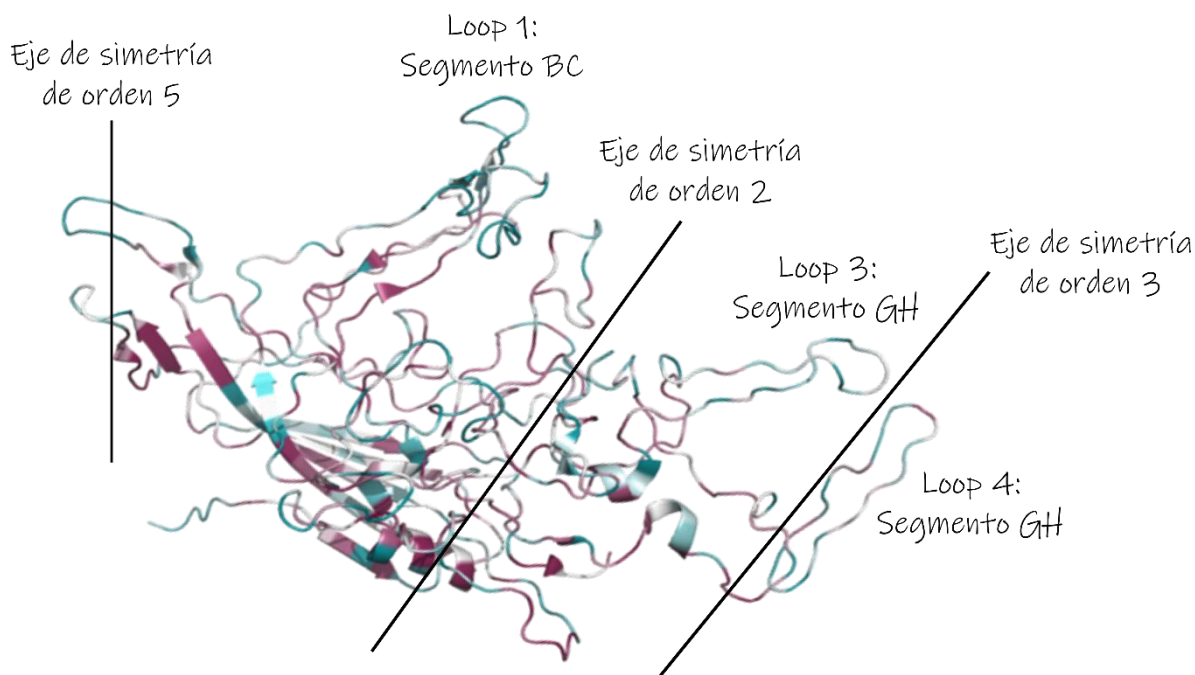


Fig. 2. Análisis de conservación de VP2 mediante el servidor ConSurf. En azul las regiones poco conservadas y en rosa las regiones mayormente conservadas. El alineamiento se realizó contra 8 secuencias con un máximo de identidad del 95% y un mínimo de 35%.

Es importante destacar que el análisis de conservación se llevó a cabo solo con 8 secuencias, entre las que se encuentran la secuencia de la proteína integral del parvovirus de macaco, chimpancé, bovino, etc. usando el algoritmo HMMER [10, 11]. Adicionalmente, se sabe que la proteína estructural del AAV-2 presenta un RMSD de 1.8 Å al alinearla con la proteína VP2 del B19V, compartiendo 400 C $\alpha$  equivalentes, lo que representa el 77% de la estructura [5]. En ambos viriones el poro presente en el eje de simetría de orden 5 es generado por el asa DE, este eje de simetría es homólogo a los presentes en FPV y MVM (Fig. 1) [5, 9]. Sin embargo, en el B19V el pico del asa DE se ve orientado hacia el centro del canal, donde 5 treoninas equivalentes (Thr135) y no conservadas (Fig. 2) generan una compuerta polar sin carga al final del canal de aproximadamente 9 Å de diámetro. Esto contrasta con el poro de 18 Å del AAV-2 generado por el Asn189, o el poro de 14 Å del FPV generado por la Thr158 [5].

La proteína VP1 comparte la región VP con la proteína VP2, adicionando en su N-terminal 227 AA. los cuales conforman la región única de VP1 (VP1u). Dentro de



esta región se encuentra, al igual que en otros virus de la familia, un dominio con actividad intrínseca de fosfolipasa tipo 2 (PLA<sub>2</sub>), necesaria para mantener la infectividad del virus [2,12,13]. Así como uno de los posibles dominios de reconocimiento celular y el tripéptido de unión a la integrina  $\alpha 5\beta 1$ , que se postula, media la internalización celular [1, 12, 13, 14, 15, 16]. Por este motivo la topología de VP1 y la dinámica de los posibles cambios conformacionales en ella son de gran importancia para determinar la interacción con las células blanco.

Sobre la localización de VP1 se debaten dos posibilidades: 1) puede ser que esté expuesta, al menos parcialmente, en la superficie del virión; o 2) como sucede con otros virus de la familia, puede estar localizada dentro de la cápside, próxima al poro formado alrededor del eje de simetría de orden 5, y solo se expondría en la superficie durante daño al virión (endocitosis) o en la primera fase de interacción con las células diana [1, 2]. Sin embargo, por su escasez en el virión, su localización no ha sido observada ni su estructura elucidada.

### *Interacciones del B19V con las células blanco.*

La primera interacción de cualquier parvovirus con su célula blanco es a través de moléculas en la superficie celular. Una característica en común de las interacciones de la cápside de diferentes parvovirus, parece ser la participación de estructuras cercanas al eje de simetría de orden 3 con los receptores celulares [17, 18, 19].

El B19V tiene un tropismo elevado por precursores eritrocitarios de la médula ósea, restringiendo la replicación a este tipo de células [20]. Uno de los receptores identificados es un globosido-glicolípido (globotetraosilceramida, Gb4Cer) [19], el cual contiene un tetrasacárido formado por un motivo de glucosa, dos motivos de galactosa y una N-acetil-galactosamina terminal [19]. En experimentos *in vitro* mediante cryoEM a 26 Å se logró resolver que el parvovirus B19V reconoce al Gb4Cer, en la porción helicoidal del tetrasacárido, mediante una depresión en el eje de simetría de orden 3 [21], justo en la misma región donde se da la neutralización de dos de los anticuerpos monoclonales conocidos para B19V [2,3]. Una vez que se da la unión se puede observar un pequeño cambio conformacional tanto en el eje de simetría de orden 2 como en el de orden 5 (Fig. 3) [19].

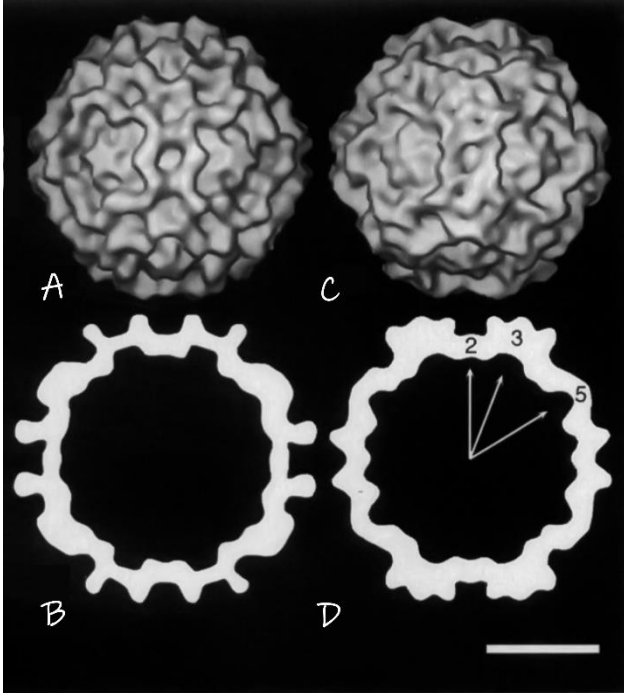


Fig. 3. Comparación de VLPs de VP2 del parvovirus B19 antes y después de la unión con Gb4Cer. Modificado de Chipman *et al.*, 1996. En las figuras A y B se puede observar la reconstrucción de la cápside del B19V, comparándolo con las figuras C y D en las que las cápsides fueron tratadas con el GB4Cer. Se pueden apreciar cambios en los ejes de simetría de orden 3, 2 y 5.

Hay diferentes evidencias que indican que el Gb4Cer se encuentra dentro de las balsas lipídicas en la membrana celular [18], Quattrocchi y colaboradores reportaron la localización de Gb4Cer junto con el receptor GM1, el cual se tiene bien identificado que solo se encuentra presente en las balsas lipídicas. Además, se observó una inhibición en la infección después de la ruptura de las balsas, sin embargo, el mecanismo exacto por el que estos microdominios contribuyen a la infección viral es aún desconocido [18].

A pesar de que los sitios de reconocimiento de los Parvovirus son muy variados, diferentes estudios indican que la mayoría de ellos se internalizan por endocitosis mediante receptores de clatrina, alcanzando rápidamente el lisosoma. Sin embargo, debido a que las claveolas son parte estructural de las balsas lipídicas no se descarta que la internalización de B19V esté mediada, secundariamente, por este sistema. La figura 4 muestra un esquema con las diferencias entre ambos mecanismos de internalización [3, 17, 18].

La presencia del Gb4Cer no es única de las células progenitoras de la serie eritroide y de eritrocitos. También se ha encontrado en otros linajes celulares como son los megacarioblastos, mieloblastos, células del cordón umbilical, miocitos fetales, fibroblastos de pulmón, células endoteliales, hepatocitos y en algunas células B, sin embargo, en estos tipos celulares la infección se ve limitada [1, 3, 15].

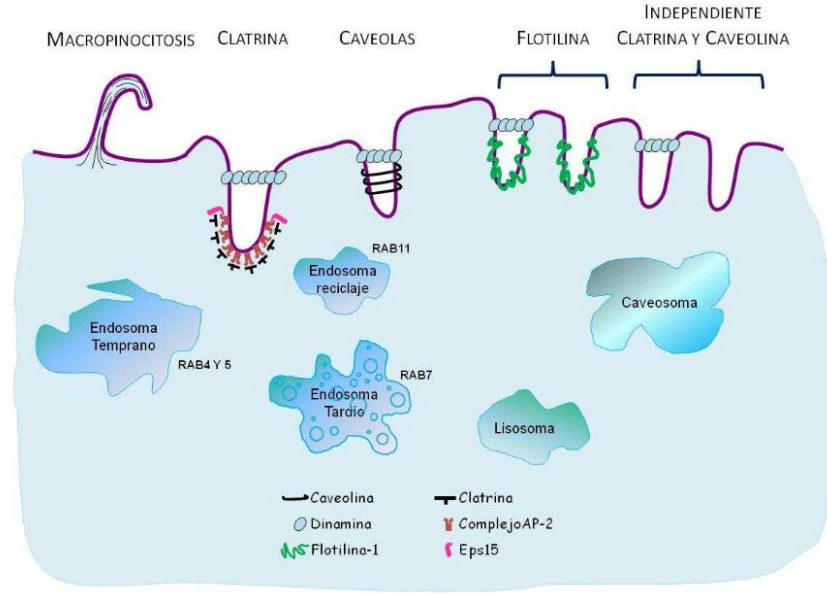


Fig. 4. Formación de las vesículas de Clatrina. Tomado de Gutiérrez y López, 2010.

Se han realizado varios experimentos para comprobar que el Gb4Cer efectivamente es el receptor del B19V. En experimentos con células blanco pre-incubadas con anticuerpos monoclonales específicos contra Gb4Cer se logró bloquear completamente la infección [3]. En otro experimento, purificados de Gb4Cer inhibieron la hemaglutinación por B19V. Además, aquellos eritrocitos que no presentan el antígeno P (Gb4Cer) en su membrana, no pueden ser aglutinados por el virus. En estudios con células de médula ósea de pacientes que genéticamente presentaban ausencia del antígeno P, se demostró tolerancia a la infección aún en presencia de altas dosis del B19V [3]. Sin embargo, la unión al Gb4Cer no basta para la internalización celular. Diversas investigaciones apuntan a que esta molécula solo contribuye a la unión del virus con la membrana de las células hospederas [1, 15, 19, 22].

Otro receptor postulado para mediar la internalización celular es la integrina  $\alpha 5 \beta 1$  (heterodímero de la subunidad  $\alpha 5$  y la subunidad  $\beta 1$ ), se propone que el sitio de interacción en la cápside se encuentra en la región única de VP1, el cual sería accesible después de un primer contacto con la célula diana, exponiendo así el tripéptido [1,3, 13, 23].

Se ha observado que la integrina  $\alpha 5 \beta 1$  se une al motivo RGD presente en el N-terminal de la región VP1u de eritrovirus de simios y monos rhesus, y que se puede alinear con la región RGE del B19V (residuos del 104 al 106). A pesar de que el tripéptido RGD es el motivo clásico de unión para la integrina  $\alpha 5 \beta 1$ , el motivo RGE de la VP1u se ha encontrado interaccionando con esta integrina [18]. En otros

estudios se observó que la infección de B19V no fue inhibida por péptidos que incluyen el motivo RGD, lo que incrementa la posibilidad de que la interacción B19V-Integrina difiera de la forma clásica con el motivo RGD [18].

La integrina  $\alpha 5\beta 1$  funciona como receptor de la fibronectina embebida en la matriz celular, la unión de estas dos participa en numerosas funciones incluidas el anclaje, tráfico, proliferación y diferenciación celular. Esta integrina es normalmente expresada en la superficie de las células susceptibles como son las células progenitoras de eritrocitos [13]. En experimentos donde se desestabilizó la forma activa de la integrina  $\beta 1$ , utilizando células K562 previamente tratadas con PMA, se encontró una reducción en la localización nuclear del parvovirus B19V; y por el contrario la activación química y estabilización de la integrina condujo al incremento de la entrada del parvovirus B19 [22].

Leisi y colaboradores compararon la internalización tanto de virus nativos como de VLPs compuestas por las proteínas VP1/VP2 y VLPs de VP2 únicamente, en líneas celulares UT7/Epo, encontrando que la internalización era llevada a cabo únicamente por los virus nativos y las VLPs que contenían la proteína estructural VP1 [15]. Sugiriendo que a pesar de que VP1 es la proteína minoritaria, su región única (VP1u) es indispensable para la infección [15,19].

En línea con el complejo mecanismo de internalización del B19V basado en múltiples receptores, se puede observar que la unión del B19V a la membrana celular mediante el Gb4Cer no es estable por si sola, por lo que necesita de los demás receptores para mantenerse [19]. Bönch y colaboradores en 2010 reportaron que tanto la interacción de las cápsidas con la superficie celular, como la internalización a la célula, son procesos que requieren de varias etapas, proponiendo que en un primer paso el B19V se une a Gb4Cer, lo que provoca la externalización irreversible de la región VP1u. Una vez que esta modificación está hecha, se da la segunda interacción con la integrina  $\alpha 5\beta 1$ . Sin embargo, cuando la segunda interacción no es posible, el virus se separa del Gb4Cer y está listo para un nuevo evento de unión, repitiéndose hasta que la segunda interacción ocurre para lograr la internalización (Fig. 5) [19].

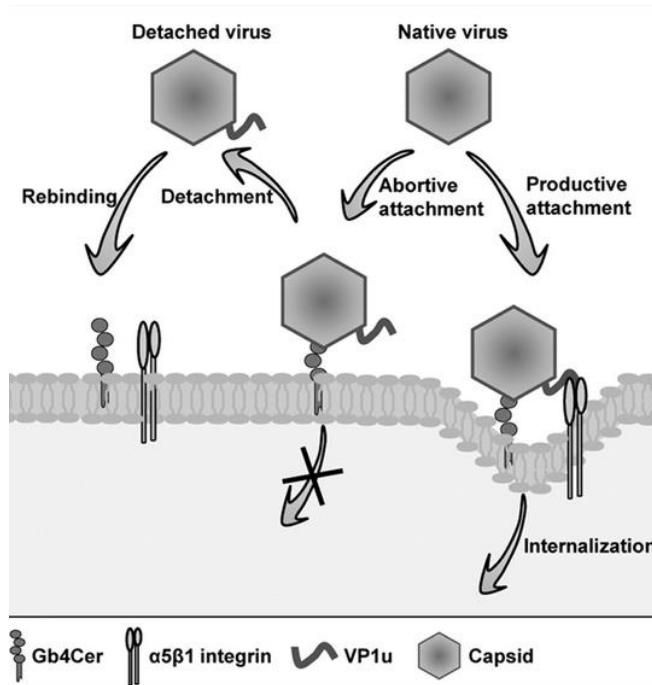


Fig. 5. Esquema de la unión e internalización de B19V a la célula blanco. Tomado de Bönsch *et al.*,

Sin embargo, la postura del cambio conformacional que generaría la exposición de la VP1u al unirse las cápsides virales con el Gb4Cer fue puesta en duda por Bieri y Ros en 2019 [23], al observar que no se presentan diferencias significativas en la unión, internalización y exposición de la VP1u del B19V comparando células UT7/Epo a las cuales se les eliminó el GB4Cer de la membrana celular contra las células UT7/Epo silvestres (Fig. 6).

Es de resaltar que este descubrimiento no pone en juicio que el Gb4Cer es un receptor fundamental para el ciclo de replicación del parvovirus B19, ya que se encontró que las células carentes del antígeno P limitaban la infección del B19V al no expresar la proteína no estructural NS1, necesaria para la replicación ADN viral (Fig. 7), siendo por lo tanto fundamental para mantener la infección [23].

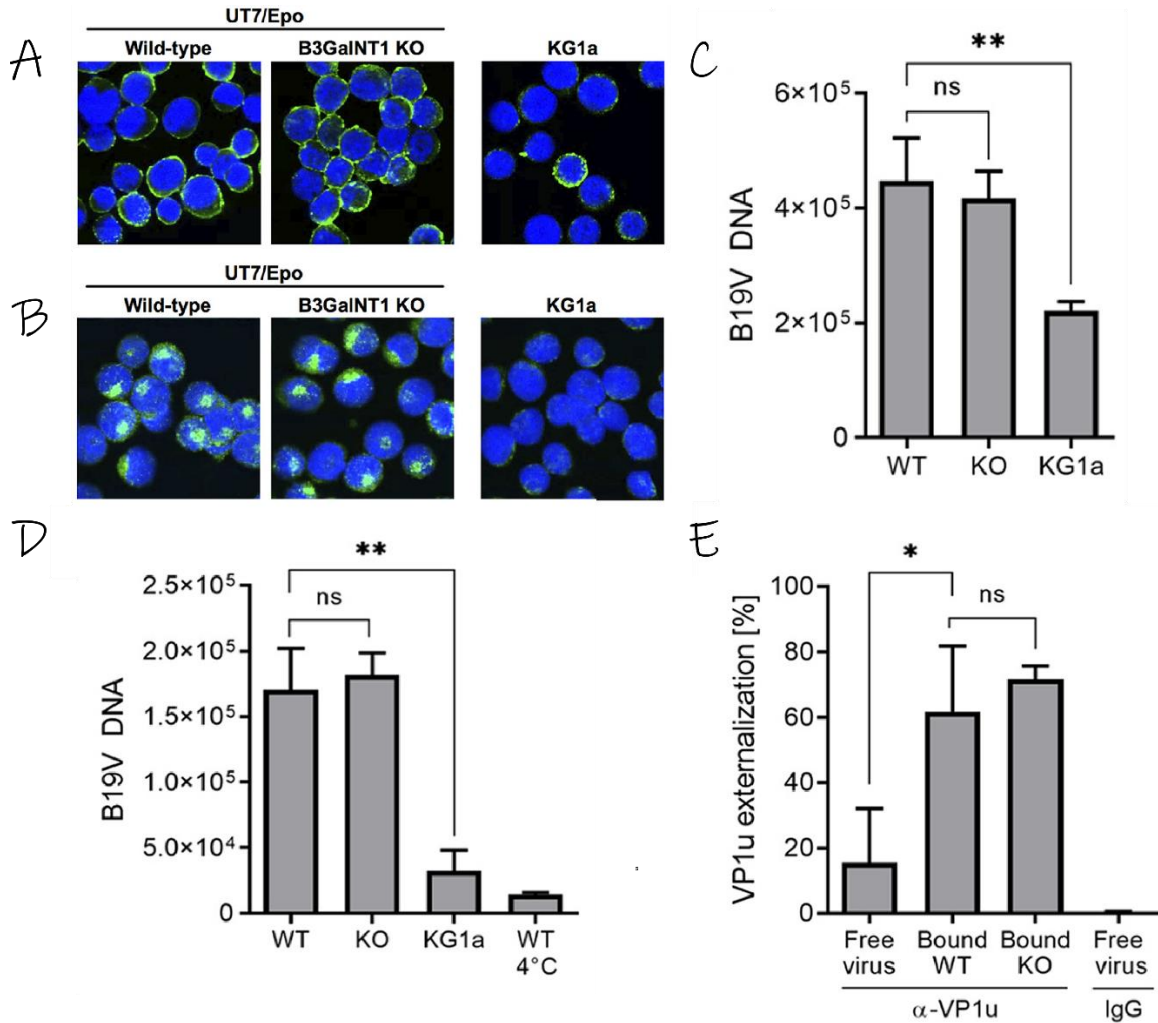


Fig. 6. Efecto de la presencia o ausencia del Gb4Cer en células UT7/Epo, permisivas para la infección del B19V. A) Detección por microscopía confocal de la unión del B19V mediante inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo 860-5SD contra las cápsidas virales. B) Detección por microscopía confocal de la internalización del B19V mediante inmunofluorescencia con el anticuerpo 860-5SD. C) Cuantificación del B19V unido a las células, mediante PCR. D) Cuantificación del B19V internalizado en las células, mediante PCR. E) Cuantificación de las VP1u expuestas para los viriones libres y unidos a las células, la presencia de VP1u fue medida mediante qPCR para anticuerpo de conejo contra la región PLA<sub>2</sub>. Tomado de Bieri y Ros, 2019.

Bieri y Ros observaron que, si es cierto que la interacción con el Gb4Cer no promueve la externalización de la región única de VP1, si es necesaria una interacción para que la VP1u quede completamente expuesta (Fig. 6E) [23]. En 2016 Leisi y colaboradores [16] propusieron la existencia de un dominio adicional de unión a receptor (RBD) ubicado en el extremo amino de la región única de VP1, conformado por los residuos 5 al 80, necesario para la unión e internalización celular. Los estudios de internalización arrojaron que aquellas mutantes trucas dentro de este segmento perdían paulatinamente su capacidad para internalizarse



en las células blanco UT7/Epo. Adicionalmente, el hecho de encontrar la mayor parte de los epítomos de neutralización para VP1u entre los aminoácidos 20-80 sugiere la relevancia funcional de motivos en esta región [16].

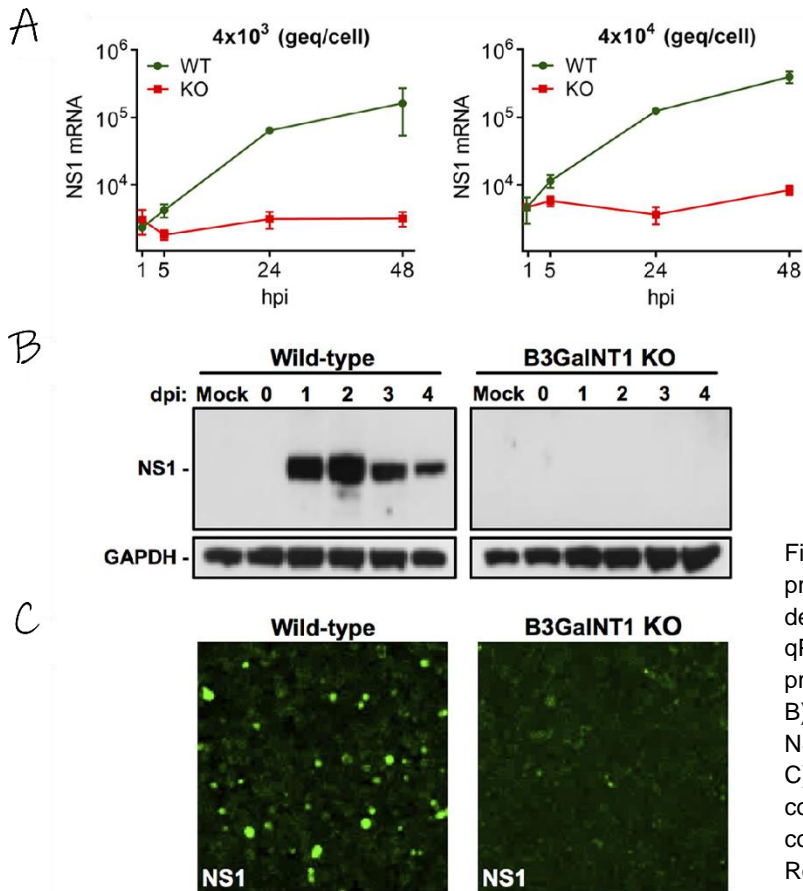


Fig. 7. Bloqueo de la expresión de la proteína NS1 en células carentes del Gb4Cer. A) Detección por RT-qPCR de la transcripción de la proteína NS1 mediante su mRNA. B) Detección por WB de la proteína NS1 a diferentes días de infección. C) Detección mediante microscopía confocal de la proteína NS1 tiñiendo con anti-NS1. Tomado de Bieri y Ros, 2019.

Como ya se mencionó, actualmente no se cuenta con una estructura cristalográfica para la región única de VP1. Leisi y colaboradores utilizaron el servidor Quark para generar un modelo de la VP1u que pudiera explicar, o ayudar a entender de mejor manera, por qué la unión e internalización del B19V se ve afectada al truncar la región entre los residuos 5 y 80 [16].

Su modelo fue generado utilizando la secuencia de la región VP1u del residuo 1 al 101, esta secuencia arrojó la formación de 3 hélices  $\alpha$  (Fig. 8): hélice 1 (AA. 14-31), hélice 2 (AA. 35-45) y hélice 3 (AA. 59-68), de las cuales solo la primera está conservada para otros parvovirus como el del macaco Rhesus [16].

Los aminoácidos F15, A18, Q22, F23 y F26, ubicados en la primera hélice  $\alpha$  presentan una alta conservación con respecto a otros parvovirus. Estos aminoácidos le confieren un carácter anfífilo a la hélice, lo que se postula sería de

relevancia para la funcionalidad de este dominio. Adicionalmente se encontró que, al hacer mutaciones sencillas en los aminoácidos antes mencionados la internalización celular se abate, al igual que al hacer mutaciones dobles con GG, las cuales rompen el motivo de las 3 hélices alfa [16]. Aún con esta información no se ha logrado dilucidar cual es el receptor celular que reconoce este dominio.

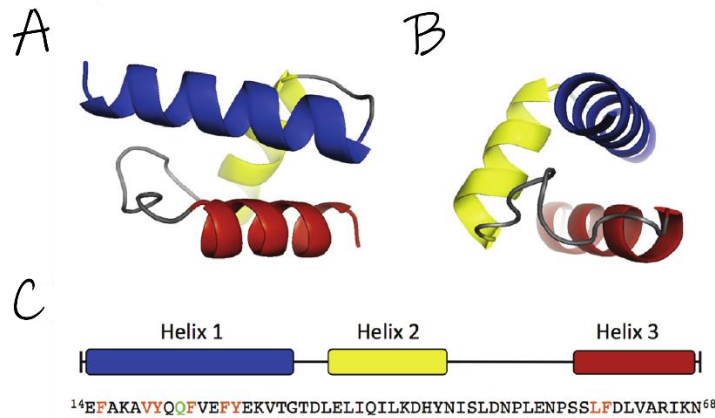


Fig. 8. Modelo *ab initio* de las 3 hélices  $\alpha$  propuestas por Leisi y colaboradores en 2016. Se aprecia en azul la hélice 1, en amarillo la hélice 2 y en rojo la hélice 3. En el panel A se muestra el modelo de frente con el extremo N-terminal a la izquierda y el C-terminal a la derecha. En el panel B se muestra la vista lateral para las 3 hélices  $\alpha$ . Por último, en el panel C se muestra la distribución de las hélices a lo largo de la secuencia de la VP1u. Tomado de Leisi et al., 2016.

Es de resaltar que el sitio de unión a receptor propuesto por Leisi y colaboradores es muy próximo al N-terminal, por lo que el mecanismo de internalización celular podría ser en varios pasos como se propuso anteriormente. De tal modo que, una vez que se da la interacción con el dominio de unión a receptor, se generó un cambio conformacional que externalice el dominio RGE que interaccione con la integrina  $\alpha 5\beta 1$ , la cual lleve a cabo la internalización celular. Adicionalmente se expondría el sitio catalítico para el posterior uso en el lisosoma. Sin dejar de lado la interacción entre un segmento del eje de simetría de orden 3 de la cápside y el Gb4Cer, interacción que posteriormente mediará la sobreexpresión de la proteína NS1 para continuar con la infección viral. En la Figura 9 se muestra el esquema de este mecanismo de internalización propuesto con la evidencia hasta ahora recabada.



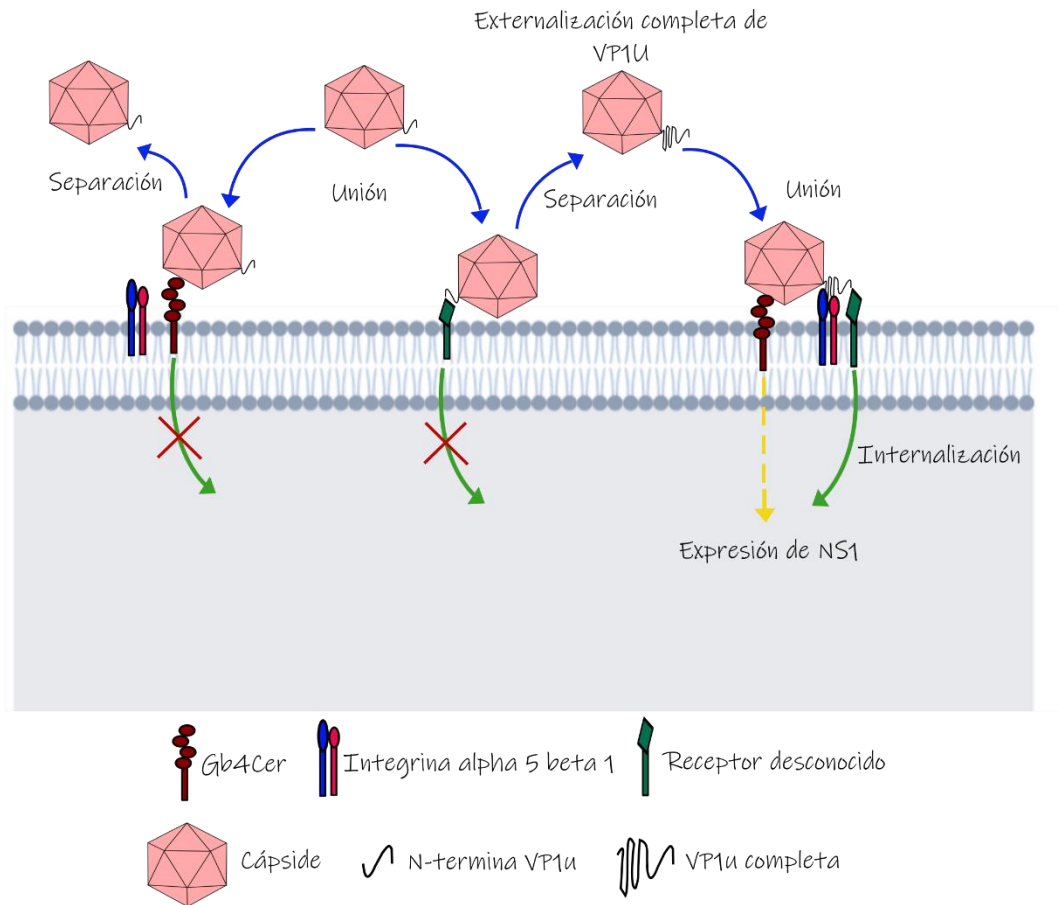


Fig. 9. Esquema propuesto para las interacciones e internalización del B19V.

El equipo de Munakata en 2005 demostró que adicionalmente al Gb4Cer y la integrina  $\alpha 5\beta 1$ , otra molécula es capaz de unirse con la superficie del parvovirus B19. Esta molécula fue identificada como la proteína Ku80. En el estudio incluyeron líneas celulares con diferentes características para lograr evaluar la importancia del Ku80 en el ciclo de replicación del virus: al utilizar líneas celulares que, de los tres receptores únicamente contuvieran el Ku80 (U937, H9 y ACHN) no lograron cuantificar ADN viral; como en el caso de aquellos linajes celulares que además del Ku80 contenían tanto al Gb4Cer como a la integrina  $\alpha 5\beta 1$ . Adicionalmente incluyeron líneas celulares no permisivas a la infección del B19V, a pesar de contener en la superficie de sus membranas los receptores Gb4Cer e integrina  $\alpha 5\beta 1$  (HeLa, T24 y SW620), en este tipo de células, al no ser permisivas, tampoco se logró cuantificar el ADN viral [24].

Para estudiar que tan crítica es la presencia del Ku80 en el ciclo de replicación del virus, transfectaron células no permisivas HeLa con el gen de la proteína Ku80 (HeLa-Ku80), en este tipo de células fue posible cuantificar ADN viral después de

30 min de estar en contacto con el virus, así como la presencia de las proteínas estructurales en el citoplasma celular. Este resultado confirma que la proteína Ku80 es uno de los receptores específicos para la infección del B19V, sin embargo, el rol específico que desempeña es aún desconocido, al ser una proteína nuclear es probable que su principal participación ocurra en la regulación a nivel de la replicación viral, aunque su intervención en la internalización celular no se puede descartar, ya que al igual que la integrina  $\alpha 5\beta 1$  el Ku80 puede participar en interacciones con la fibronectina [24].

Una vez en el citoplasma los parvovirus se dirigen al perinúcleo, mediante movimientos dependientes de micro-tubulina, para hacer llegar su material genético al núcleo de las células hospederas [25, 26]. Para esto se requiere de transportadores específicos hacia el interior del núcleo en las dos diferentes etapas del ciclo de replicación. En la etapa temprana las cápsides necesitan internalizarse al núcleo para liberar el material genético, mientras que en la etapa tardía las nuevas proteínas sintetizadas se ensamblan en trímeros antes de ser transportadas [27, 28].

La vía canónica de entrada al núcleo celular, que muchos virus utilizan, es el complejo de poro nuclear (NPC) [26]. Únicamente las proteínas que contienen las señales de localización nuclear (NLS) pueden atravesar el NPC. Muchas NLS han sido identificadas y están compuestas de agrupaciones de aminoácidos básicos, como la del virus SV40 (PKKKRKV); el motivo Pat4, que consiste en 4 AA. básicos continuos, y el motivo Pat7, que consta de un motivo de prolinas seguidas de 3 a 4 AA. básicos después de una interrupción de 1 a 3 aminoácidos [P-X(1-3)-(3-4 K/R)]. Además de estas dos NLS continuas, se conocen otras NLS que consisten en dos aminoácidos básicos separados por un pequeño puente (*linker*) de aminoácidos, siendo un punto clave el acceso de los motivos con los transportadores [27, 29].

De manera general se considera que, al medir aproximadamente 26 nm de diámetro, las cápsides de los parvovirus logran entrar intactas al núcleo celular mediante el NPC. Hay evidencia que sugiere que los parvovirus y los poliomavirus pueden no utilizar el NPC, y atravesar directamente la membrana nuclear [25, 26]. Tanto las VLPs del AAV-2 como del MVM se han encontrado internalizándose al núcleo intactas. Es de resaltar que, en estos casos, los mecanismos por los que se internalizan estos parvovirus varían, sugiriendo que, la entrada al núcleo sigue rutas específicas para cada miembro de la familia de los parvovirus [25, 26].

Las proteínas estructurales de muchos parvovirus muestran la presencia de regiones básicas (BRs), que podrían actuar como NLS y que se pueden encontrar en cualquiera de sus proteínas estructurales, como en el caso de AVV-2, o exclusivamente en la VP1u, como en los parvovirus MVM y CPV [27, 29, 30]. La

VP1u de varios parvovirus contiene 4 secuencias putativas de NLS localizadas en el N-terminal de VP1, abarcando el dominio de PLA<sub>2</sub>, se ha logrado demostrar que el proceso de translocación es ATP-dependiente [26, 28, 30]. El PPV adicionalmente presenta un motivo formado en el eje de simetría de orden 3, nombrado motivo de localización nuclear (NLM), el cual consta de los AA. K475 y R477 de los tres monómeros; este NLM podría proporcionar solo la salida para aquellos trímeros bien ensamblados [27].

En el caso del B19V se demostró que después de 24 horas la proteína VP2 nativa se encontraba exclusivamente en el núcleo de las células infectadas. Adicionalmente se observó que aquellas partículas de VP2 con una delección de 111 residuos en el C-terminal, se encontraron en el citoplasma de las células infectadas. Otros experimentos con mutaciones entre los primeros 60 aminoácidos del C-terminal demostraron que el motivo KLFPRKATGRW es el que presenta un mayor papel como NLS no convencional. Sin embargo, no existe una secuencia de NLS homóloga aparente entre la proteína VP2 de los eritrovirus y otros parvovirus [27, 29].

#### *Actividad de Fosfolipasa A2 (PLA<sub>2</sub>) en el Parvovirus B19V.*

Los fosfolípidos son moléculas que consisten en un esqueleto de glicerol unido en su posición sn-1 a un ácido graso, usualmente saturado. En su posición sn-2 a un ácido graso usualmente insaturado y en la posición sn-3 a un grupo fosfato esterificado con alguna otra molécula. Los dos fosfolípidos más comunes son la fosfatidilcolina y el difosfatidilglicerol, ambos con características de sal interna (*switterion*). La fosfatidilcolina presenta un ácido palmítico o esteárico en posición sn-1 y ácido oleico o linoleico en posición sn-2 [3].

Las fosfolipasas (PLAs) se clasifican de acuerdo con el enlace éster que hidrolizan (Fig. 10). Estas enzimas juegan un papel fundamental en un gran número de procesos biológicos, incluyendo la homeostasis de las membranas celulares, digestión de lípidos y la producción de potentes mediadores lipídicos [13, 31].

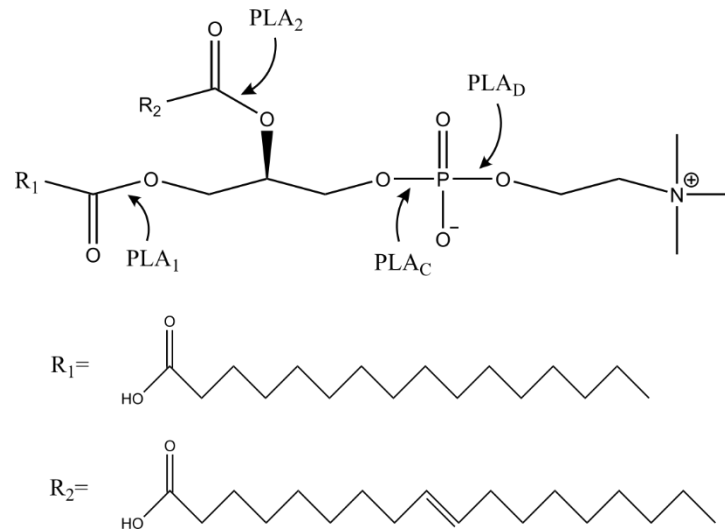


Fig. 10. Sitios de hidrólisis de las PLAs sobre Fosfatidilcolina.

La hidrólisis de las fosfolipasas tipo 2 (PLA<sub>2</sub>) libera un ácido graso y el liso-fosfolípido correspondiente. Se han podido clasificar por su funcionalidad y localización celular en dos grandes tipos: a) Citosólicas y de alto peso molecular y b) Secretorias y de bajo peso molecular. Por su dependencia de calcio se clasifican en variedades Calcio-dependientes y Calcio-independientes. Además, se pueden clasificar en cinco tipos enzimáticos principales: 1) Enzimas secretadas (sPLA<sub>2</sub>), 2) Enzimas citosólicas (cPLA<sub>2</sub>), 3) Enzimas calcio-independientes (iPLA<sub>2</sub>), 4) Enzimas que hidrolizan los mediadores autocoides conocidos como factores activadores plaquetarios (PLA<sub>2</sub>-PAF-AH), y 5) Enzimas lisosomales calcio-independientes (L-PLA<sub>2</sub>) (Fig. 11) [31].

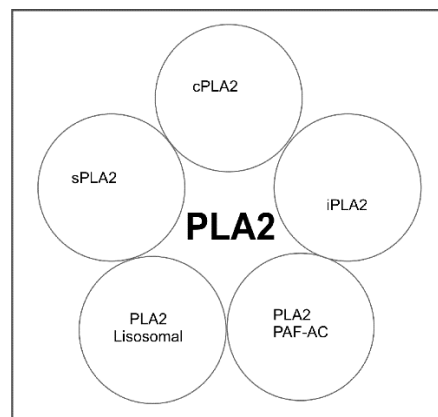


Fig. 11. Clasificación de las PLA<sub>2</sub>. Tomado de García y García, 2009.

La fosfolipasa encontrada en el B19V se encuentra dentro de las sPLA<sub>2</sub>. Estas enzimas adicionalmente se pueden encontrar en insectos, moluscos, reptiles, mamíferos, hongos y bacterias simbióticas de mamíferos [31]. Las variedades secretoras son proteínas de bajo peso molecular (14-18 kDa) y estructuralmente contienen de cinco a ocho puentes disulfuro [31].

A pesar de la poca identidad entre secuencias de diferentes sPLA<sub>2</sub>, la comparación entre ellas ha revelado un dominio sumamente conservado en la estructura proteica de muchos parvovirus de vertebrados y de insectos, lo que sugiere que este dominio es crucial en el ciclo de vida de los virus [12, 13]. El análisis de las secuencias de VP1u para 34 parvovirus revelaron que 31 de ellos tienen conservadas las secuencias HDXXY y YXGXG para el sitio catalítico y el asa de unión a Ca<sup>2+</sup>, respectivamente. Fuera de estos dos dominios la conservación entre la VP1u y las sPLA<sub>2</sub> es poca [3, 13].

El análisis de las estructuras cristalográficas de distintas sPLA<sub>2</sub> muestra que su sitio activo está compuesto por la diada catalítica His-Asp [13, 31]. El mecanismo propuesto para las sPLA<sub>2</sub> incluye a la His48/Asp99 como parte del sitio activo. La His48 se encuentra adyacente al Asp49, residuo que, junto con el asa de unión específica a Ca<sup>2+</sup>, coordina al carbonilo sn-2 del sustrato, estabilizando la formación de un oxianión que forma parte del mecanismo de reacción (Fig. 12) [32]. En el caso de la región VP1u del parvovirus B19, los aminoácidos catalíticos corresponden a His153, Asp154 y Asp195, y el asa de unión a calcio está compuesta por los residuos YVGPG (AA. 130-134) [33].

La base de esta diada catalítica propone la desprotonación de una molécula de agua (w5) por la histidina catalítica, lo que facilita el ataque nucleofílico al carbonilo polarizado de la posición sn-2 en el sustrato, que se encuentra coordinado con el sitio activo y el ion Ca<sup>2+</sup>, produciendo un oxianión intermediario. El colapso subsecuente de este intermediario genera los productos: ácido graso y lisofosfolípido. Teniendo en mente este mecanismo de reacción, se puede inferir que el paso limitante de la reacción es la formación del intermediario tetraédrico [32]. Es de resaltar que la enzima no se disocia de la membrana después de la catálisis (Hopping mode) si no que se mueve a otra molécula sustrato [3].

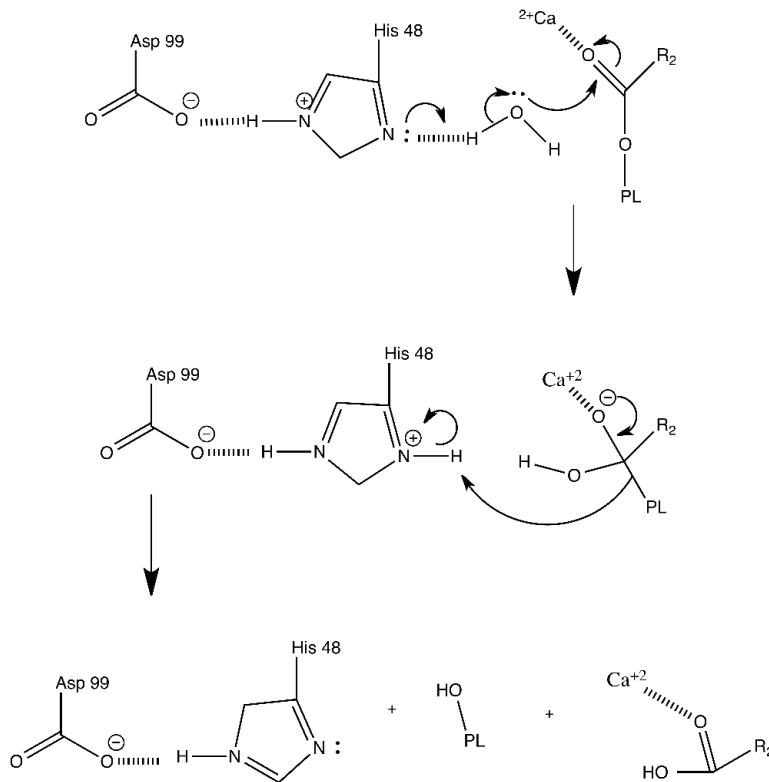


Fig. 12. Mecanismo de acción propuesto para las sPLA<sub>2</sub>. Tomado de Edwards *et al.*, 2002.

Vale la pena destacar que las VP1u del parvovirus porcino (PPV), del B19V y del AAV-2 no presentan preferencia por cadenas sn-2 saturadas o polinsaturadas como es típico en la mayoría de las sPLA<sub>2</sub> [12, 13, 14]. Los principales fosfolípidos para los que se presenta mayor actividad de PLA<sub>2</sub> de las diferentes VP1u son el fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina y fosfatidilserina [3].

En cuanto al sitio de unión a  $Ca^{2+}$ , se ha comprobado que tanto la VP1u del B19V como las del AAV-2, FPV y CPV presentan una fuerte afinidad por este ion, lo cual indica que, para la unión del sustrato al sitio activo de estas sPLA<sub>2</sub> es necesario la presencia del ion en concentraciones que van de submilimolares a milimolares [8, 12, 13]. Esto es aproximadamente 1000 veces más de las que se encuentran presentes en el citoplasma, lo que sugiere que estas enzimas actúan extracelularmente o en organelos que tengan la presencia del fluido extracelular [3, 12]. Adicionalmente, en estudios con VP1u de varios parvovirus, incluyendo el B19V, se ha observado que el intervalo de pH para alcanzar la máxima actividad de PLA<sub>2</sub> es entre 5.0 y 7.0 [3].

Datos obtenidos con mutantes que afectan la actividad de PLA<sub>2</sub> de la VP1u del parvovirus porcino (PPV) indicaron que, después de la transfección, no se vieron afectados la replicación de DNA, la expresión proteica, la formación de la cápside, el empaquetamiento del material genético, ni la liberación de nuevos virus. Sin embargo, después de 2 a 4 horas de liberarse y entrar los nuevos virus en la ruta

clásica de endocitosis, estos mutantes se observaron acumulados en el endosoma/lisosoma tardío. Por otra parte, en estudios con baculovirus, donde se expresan las cápsides sin la región VP1u, se pudo observar la acumulación de las VLPs en la misma zona, lo cual indica que la actividad PLA<sub>2</sub> de los parvovirus actúa sobre la vía de escape del lisosoma una vez que los viriones se han internalizado a la célula [3].

### *Nano-acarreadores.*

El uso de nano-acarreadores que mejoren la eficiencia, especificidad y estabilidad de diferentes fármacos ha sido sumamente estudiado en la década pasada, pensando principalmente en los problemas que presentan los fármacos libres como: su toxicidad, poca especificidad y altos niveles de degradación en el torrente sanguíneo. Ejemplos de estos nano-acarreadores son las micelas, liposomas, VLPs, etc. [34].

Las VLPs son nanopartículas, idénticas a los viriones nativos, sin material genético, lo que las hace inocuas para su uso como excipientes de medicamentos. Conservan sus mecanismos naturales de reconocimiento celular e inmunogenicidad, son capaces de almacenar moléculas para protegerlas de la degradación y adicionalmente, por su composición modular, son capaces de acarrear diversas moléculas en su superficie. Estas características han posicionado a las VLPs como materiales potenciales en la fabricación de vacunas, mecanismos específicos de liberación de fármacos y como medios de contraste, por citar algunos ejemplos [34].

Debido a que el B19V es patógeno para el hombre, las VLPs de este virus tienen potencial en medicina. Típicamente las VLPs de B19V son producidas y auto-ensambladas en sistemas de expresión eucariotas, con costos relativamente más elevados que los sistemas de expresión en bacterias, pero con buenos rendimientos. Sin embargo, muchas de las potenciales aplicaciones requieren el acceso al interior de las VLPs, ya sea para la encapsulación de moléculas o para evitar que lleven productos de contaminación del mismo proceso de sobreexpresión. Esto convierte al desmontaje y re-ensamblaje de las VLPs en procesos críticos a considerar, limitando así las ventajas de los sistemas de expresión eucariotas [35].

Se ha demostrado que la proteína estructural VP2 del B19V expresada en *E. coli* tiene la capacidad de replegarse y auto ensamblarse a partir de su estado desnaturalizado, ocasionado por la presencia de agentes caotrópicos bajo condiciones controladas de pH, fuerza iónica y temperatura [35, 36]. Se ha reportado, además, que estas VLPs producidas por re-plegamiento *in vitro* no difieren de los viriones nativos al observarse en microscopía de transmisión



electrónica [35, 36]. Teniendo estos datos en mente, se ha logrado funcionalizar a las VLPs formadas exclusivamente con la proteína VP2 mediante la unión a su superficie con enzimas como la lipasa de *B. pumillus* [37], la  $\alpha$ -glucosidasa de *S. cerevisiae* [38, 39], y la proteína verde fluorescente [40]. También se ha logrado la encapsulación de ADN en estas VLPs [41], así como la formación de VLPs híbridas con al menos dos funciones nuevas en la misma partícula (presentación de diferentes motivos en la superficie de la cápside) [42]. Estas VLPs se han usado también para la construcción de nuevos materiales mediante procesos de oligomerización controlada [43].

Sin embargo, decorar VLPs con alguna otra proteína mediante fusión génica conduce a menudo a un mal plegamiento de la proteína de interés o al deficiente ensamble de las cápsides. Para salvar este tipo de inconvenientes se han desarrollado pequeños péptidos que se unen por fusión génica a las proteínas de interés, evitando así interacciones perjudiciales y logrando su purificación por separado. Finalmente, bajo condiciones óptimas para ambas proteínas los péptidos interaccionarán químicamente para dar lugar a las VLPs funcionalizadas. Uno de los sistemas con el que se ha logrado funcionalizar exitosamente las VLPs en nuestro grupo de trabajo es el sistema SpyTag-SpyCatcher.

### *Sistema SpyTag-SpyCatcher.*

La funcionalización de VLPs generalmente se logra mediante el uso de fusión génica, la cual es una técnica que suele ofrecer numerosas ventajas como la purificación e inmovilización más eficiente. Sin embargo, sigue siendo un método de prueba y error, ya que con ciertas proteínas conduce a un plegamiento incorrecto y en el caso de las VLPs puede llegar a causar un mal ensamblaje de la cápside o disminuir su estabilidad. Otro desafío importante con la fusión génica es la variación en cuanto al organismo óptimo para la expresión de las proteínas, dependiendo de sí se requieren modificaciones postraduccionales o no. Por lo tanto, la expresión por separado a menudo es lo preferible [44].

Una de las alternativas para la funcionalización de VLPs que ha dado una alta eficiencia es la adición de etiquetas de péptidos. La fusión génica de un péptido además de permitir la producción y purificación sin contratiempos de las proteínas de interés tiene la ventaja de poder unir regiones sitio específicas sin mucha complicación. El péptido, por su tamaño reducido, suele no afectar la estabilidad y plegamiento de la proteína adjunta [45].



Brune y colaboradores abordaron estos desafíos mediante la formación de un enlace amida espontaneo, genéticamente codificado: el sistema *SpyTag-SpyCatcher*, para la producción de VLPs más antigénicas (Fig. 13) [44].

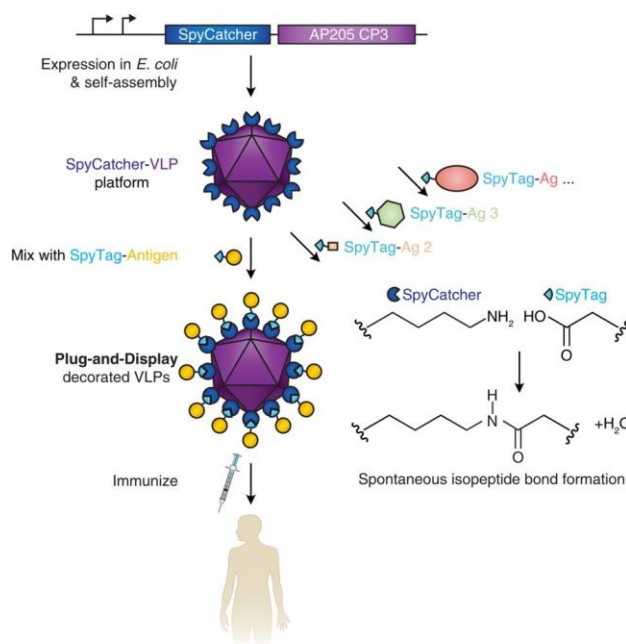


Fig. 13. Generación de Vacunas mediante la funcionalización de VLPs con antígenos usando el sistema *SpyTag-SpyCatcher*. Tomado de Brune *et al.*, 2016.

*SpyTag* es un péptido que forma un enlace isopeptídico espontáneo e irreversible con su proteína asociada *SpyCatcher* al ponerlos en contacto. Ambos péptidos pueden ser colocados en diferentes zonas de las cadenas polipeptídicas, son funcionales en un amplio intervalo de condiciones de pH (5-8) y temperatura (4-37 °C), no poseen cisteínas y adicionalmente el complejo formado es estable en SDS a ebullición. El sistema está basado en el dominio de unión a fibronectina de *Streptococcus pyogenes* (CnaB2). El CnaB2 contiene un enlace isopeptídico interno entre los residuos Lys31 y Asp117, catalizado por el Glu77 contenido en *SpyCatcher* (Fig. 14) [44, 46, 47].

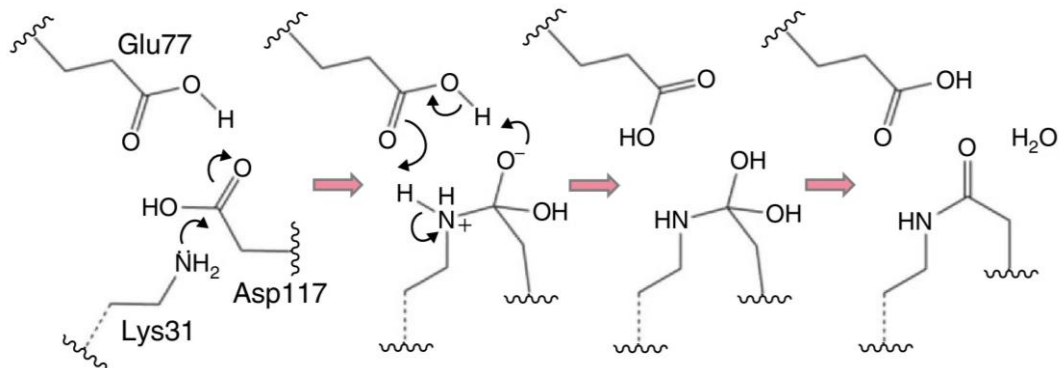


Fig. 14. Mecanismo de reacción para la formación del enlace isopeptídico del sistema SpyTag/SpyCatcher. Tomado de Li. *et al.*, 2013.

El sistema está compuesto del péptido SpyTag, que consta de 13 AA., y del dominio SpyCatcher, el cual consta de 116 AA. (Fig. 15). Ambas moléculas reaccionan rápidamente con una vida media de 74 segundos a una concentración de 10  $\mu$ M [46, 47].

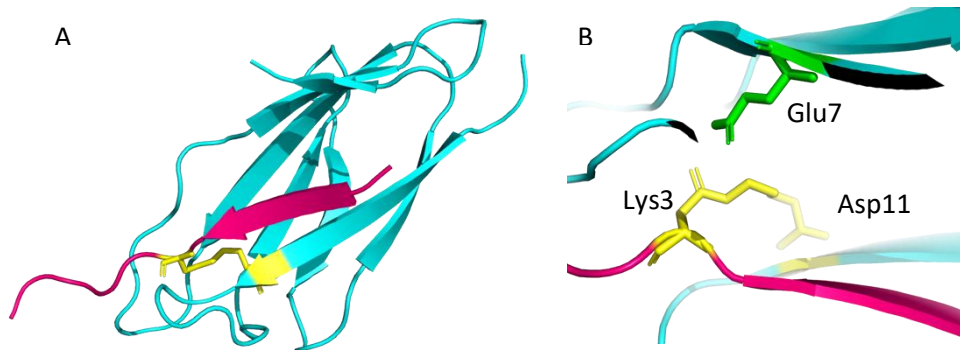


Fig. 15. Sistema SpyTag/SpyCatcher. A) Modelo del complejo SpyTag/SpyCatcher. En rosa se puede apreciar el péptido de 13 AA SpyTag, mientras que en cian se presenta la proteína de 116 AA SpyCatcher. En amarillo se muestra el sitio de interacción entre los AA. Lys31 y Asp117. B) Acercamiento al sitio de reacción, se muestra adicionalmente en verde el residuo de Glu (Glu77) que participa para que la interacción se lleve a cabo. Tomado de Li *et al.*, 2014. PDB 4MLI.

En nuestro grupo de trabajo ya se han realizado investigaciones con este sistema, en las que se demostró que no se abate la capacidad de VP2 de auto ensamblarse y en los casos estudiados se logra el correcto plegamiento y por tanto actividad de las proteínas seleccionadas [38, 39].

Las VLPs de B19V han sido hasta el momento un excelente modelo para el desarrollo de materiales con aplicaciones potenciales en biotecnología y medicina. Por otra parte, dado que la proteína estructural VP1 del B19V es clave para el tropismo e internalización celular, en este trabajo se propone sobreexpresar la proteína VP1 en *E. coli*, purificarla, replegarla, evaluar su actividad de fosfolipasa tipo 2, y caracterizar su competencia de auto ensamblaje, así como su capacidad de co-ensamblarse con la proteína VP2 para formar VLPs. Para evaluar el papel del segmento VP1u en la internalización celular, marcaremos a las VLPs formadas con VP1 con la proteína GFP utilizando el sistema SpyTag/SpyCatcher. Los resultados permitirán ampliar el potencial funcional de las VLPs del B19V.

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El empleo de VLPs del B19V optimizadas con enzimas, fluoróforos o ADN requiere del correcto tropismo e internalización del sistema a las células blanco y, en algunos casos, el escape del endosoma. Estas funciones se llevan a cabo con la intervención de la proteína VP1 en el virión nativo. Por lo que proponemos evaluar la capacidad de la proteína VP1 recombinante para replegarse, auto ensamblarse y co-ensamblarse con VP2 de manera *in vitro*. El resultado de esta investigación proporcionará información sobre la capacidad de VP1 para producir VLPs, ya sea sola o en conjunto con VP2 y las propiedades bioquímicas de la región única de VP1, como lo es su actividad de fosfolipasa, lo que permitirá ampliar las funciones potenciales de las VLPs del B19V.

### HIPÓTESIS.

La proteína VP1 se puede expresar en un sistema heterólogo procarionte como cuerpos de inclusión. Esta proteína puede ser replegada en condiciones controladas de temperatura, pH y fuerza iónica. La proteína resultante conservará sus propiedades de oligomerización para formar capsómeros y cápsides y podrá ser co-ensamblada con la proteína VP2. El VP1u también se replegará, presentará actividad de fosfolipasa tipo 2 y tendrá efecto en la internalización de estas VLPs en células que contengan los receptores adecuados.

## OBJETIVOS.

### *GENERAL.*

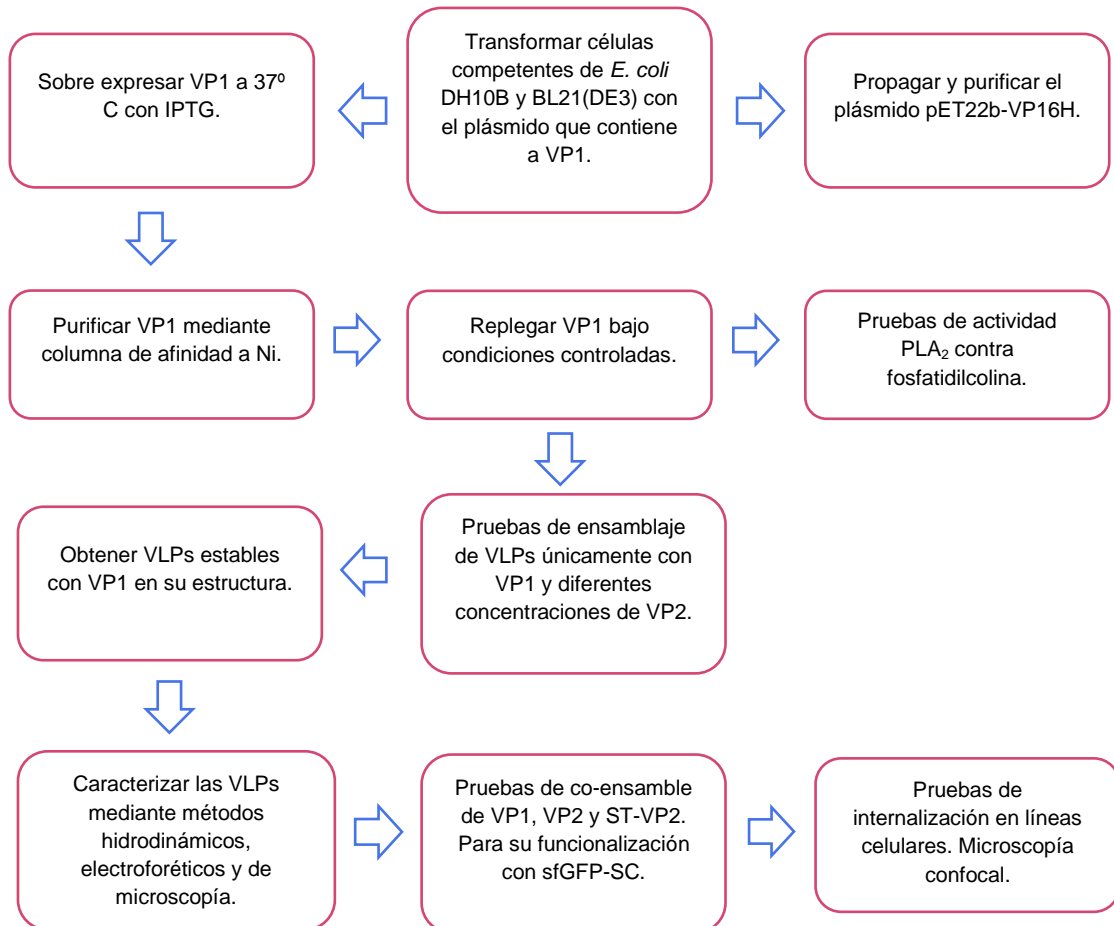
- Estudiar la capacidad de replegamiento, auto ensamblaje y co-ensamblaje de la proteína estructural VP1 del B19V y determinar si la VP1u es funcional.

### *PARTICULARES.*

- Expresar la proteína VP1 en *E. coli* mediante el sistema de expresión pET-22b(+).
- Purificar la proteína VP1 recombinante.
- Estudiar la capacidad de VP1 para auto ensamblarse.
- Estudiar la habilidad de VP1 para co-ensamblar con VP2.
- Evaluar el plegamiento de VP1u a través de su actividad PLA2.
- Caracterizar por métodos hidrodinámicos: dispersión dinámica de luz, cromatografía de exclusión molecular y ultra-centrifugación isopícnica (DLS, SEC, IC), los capsómeros y/o VLPs ensambladas.
- Caracterizar por métodos estructurales: microscopía de transmisión electrónica y la microscopía de fuerza atómica (TEM, AFM), los capsómeros y/o VLPs ensambladas.
- Generar VLPs co-ensambladas que contengan VP1, VP2 y ST-VP2 para su posterior funcionalización con la proteína fluorescente sfGFP-SC.
- Caracterizar las VLPs funcionalizadas con la proteína sfGFP-SC mediante métodos hidrodinámicos (DLS y SEC).
- Caracterizar las VLPs funcionalizadas con sfGFP-SC mediante métodos estructurales (AFM).
- Evaluar la funcionalidad de VP1u mediante pruebas de internalización celular con VLPs formadas por VP1 y funcionalizadas con sfGFP-SC.

## MATERIAL Y MÉTODOS.

### ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO:



## MATERIALES.

## Material Biológico

**Células de *E. coli* BL21(DE3):** genotipo F<sup>-</sup> ompT<sup>-</sup> gal DCM hsdS<sub>B</sub>(rb<sup>-</sup>mb<sup>-</sup>) (λclts857 ind Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5)].

**Células de *E. coli* DH10B:** genotipo str. K-12 F<sup>-</sup> Δ(*ara-leu*)7697[Δ(*rapA'*-*cra'* )] Δ(*lac*)X74[Δ(*'yahH-mhpE*)] duplication(514341-627601)[*nmpC-gltI*] *galK16 galE15 e14<sup>-</sup>* (*icd*<sup>WT</sup> *mcrA*) φ80d*lacZ*Δ*M15 recA1 relA1 endA1 Tn 10.10 nupG rpsL150*(Str<sup>R</sup>) *rph<sup>+</sup> spoT1* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) λ<sup>-</sup> Missense(*dnaA glmS glyQ lpxK mreC murA*) Nonsense(*chiA gatZ fhuA? yigA ygcG*) Frameshift(*flhC mglA fruB*).

**Células de *E. coli* BL21(DE3):** Transformadas con los plásmidos para sobre expresar las proteínas VP2, ST-VP2 y sGFP-SC

**Enzimas de Restricción:** *NdeI* y *XhoI*

**Eritrocitos:** 3 muestras diferentes

**Células HepG2**

**Plásmido pET22b-VP16H**

## Reactivos Químicos

Ácido acético glacial	Bromuro de Etidio
Ácido clorhídrico (HCl)	Clorhidrato de Guanidina (GndHCl)
Ácido etilendiamino tetracético (EDTA)	Cloruro de Calcio CaCl <sub>2</sub>
Ácido Fosfotúngstico	Cloruro de Cesio (CsCl)
Acetato de Potasio (CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> K)	Cloruro de Potasio (KCl)
Agar LB (Luria-Bertani)	Cloruro de Sodio (NaCl)
Agarosa UltraPure™	Cloroformo
Albumina sérica bovina (BSA)	Dodecilsulfato de Sodio (SDS)
Ampicilina	Etanol
Azul Brillante R-250	Fosfato de Potasio dibásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )

Fosfato de Potasio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Medio DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium)
Fosfato de Sodio dibásico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Membrana para diálisis
Fosfato de Sodio monobásico (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Metanol
Glicerol	Sulfato de Níquel (NiSO <sub>4</sub> )
Hidróxido de Sodio (NaOH)	Tris-HCl
Imidazol	Tritón X-100
Iodo (I <sub>2</sub> )	Vectashield (Aceite de inmersión)
Isopropanol	1,4-Ditioneitol (DTT)
Isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG)	1-palmitoil-2-oleoil-3-fosfatidilcolina (FC)
Matriz Ni-TED para columna de afinidad	2-Mercaptoetanol
Matriz S500 para cromatografía de exclusión molecular	4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)
Medio LB (Luria-Bertani)	

### *Amortiguadores*

**Amortiguador 1:** 500 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA y 5 mg/mL de lisozima

**Amortiguador 2:** NaOH 0.2 M y 4% de SDS

**Amortiguador 3:** CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K 5 M, pH 5

**Amortiguador TE:** Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8

**Amortiguador EB:** Tris-HCl 10 mM, pH 8.0

**Amortiguador TAE:** 35 mM Tris-HCl, 20 mM de Ácido acético glacial, 1.2 mM EDTA

**Amortiguador LAMELI:** 25 mM Tris-HCl, 0.2 M Glicina y 0.1% SDS pH 6.8

**Solución fisiológica:** NaCl 150 mM

**Amortiguador A<sub>LCl</sub>:** 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.0

**Amortiguador B<sub>LCl</sub>:** 0 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2% v/v Tritón 100x, pH 8.0

**Amortiguador C<sub>LCI</sub>:** 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3 M NaCl, 2 mM DTT, 6 M GndHCl, pH 6.3

**Amortiguador A<sub>EQ</sub>:** 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3 M NaCl, 2.5% v/v glicerol, pH 7.5

**Amortiguador A<sub>PU</sub>:** 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3 M NaCl, 3 M GndHCl, 2.5% v/v glicerol, pH 7.5

**Amortiguador B<sub>PU</sub>:** 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3 M NaCl, 3 M GndHCl, pH 7.5

**Amortiguador C<sub>PU</sub>:** 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3 M NaCl, 3 M GndHCl, 15 mM Imidazol, pH 7.5

**Amortiguador D<sub>PU</sub>:** 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3 M NaCl, 3 M GndHCl, 30 mM Imidazol, pH 7.5

**Amortiguador E<sub>PU</sub>:** 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 M NaCl, 3 M GndHCl, pH 7.5

**Amortiguador F<sub>PU</sub>:** 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3 M NaCl, 3M GndHCl, 350 mM Imidazol, pH 7.5

**Amortiguador G<sub>PU</sub>:** 20 mM Tris-HCl, 0.150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM de DTT, 5 M GndHCl, pH 8

**PBS- Arg:** 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 M Arginina, pH 7.4

**Amortiguador A<sub>GRA</sub>:** 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM EDTA, 0.5 % v/v Tritón X-100, pH 7.4

**Amortiguador A<sub>ACT</sub>:** Tris-HCl 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Tritón X-100 2 mM, pH 7.5

**Amortiguador B<sub>ACT</sub>:** NaCl 0.88% y CaCl<sub>2</sub> 2 mM pH 7.4

**PBS2x-Arg:** 274 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 M Arginina, pH 7.4

**Amortiguador BPS-Tripsina:** 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Tripsina al 0.05% pH 7.4

### *Instrumentos y Equipos*

<b>Instrumento o Equipo</b>	<b>Marca</b>
Balanza analítica BP 221S	Sartorius
Balanza de dos platos	
Baño refrigerante	Hoefler Scientific Instruments
Electroporador MicroPulser™	Bio Rad
Centrifuga Refrigerante RC 6+	Thermo Scientific Sorvall
Centrifuga Refrigerada 5702 R	Eppendorf
Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC)	Waters
Espectrofotómetro biochrome	Libra



Incubadora MaxQ400	Thermo Scientific
Micro Centrifuga 5418	Eppendorf
Micro pipetas (5, 20, 100, 200, 1000 $\mu$ L)	Eppendorf/ Gilson
Microscopio confocal TCS SP5 X	Leica Microsystems
Microscopio de fuerza atómica Innova	Veeco Instruments Inc.
Microscopio de transmisión electrónica	JEOL JEM-ARM200F
Potenciómetro pH 700	Oakton
Sonicador CPX 750	Cole Parmer
Trans-iluminador UV T1203	Sigma
Termomixer confort	Eppendorf
Ultra centrifuga Optima™ XL-100K Class S	Beckman
Vortex	
Zetasizer $\mu$ V	Malvern Instruments

## METODOLOGÍA

### *Análisis in silico de la VP1u para la obtención de un modelo tridimensional.*

Como se mencionó anteriormente, no se conoce la estructura de la región única de VP1, por lo que la secuencia se sometió a análisis *in silico* utilizando los servidores ITASSER, ROSETTA y Quark para obtener un modelo para su visualización y análisis [48, 49, 50, 51, 52, 53].

Para la validación de los modelos obtenidos por los diferentes servidores se utilizó el servidor SAVES [54]. Así mismo, para la elección del mejor modelo se tomó en cuenta la integridad y similitud (RMSD) del dominio de PLA<sub>2</sub> contra otras fosfolipasas.

### *Transformación de células de E. coli DH10B para la propagación del plásmido pET22b-VP16H.*

En este trabajo se utilizó la proteína VP1 fusionada a una etiqueta de 6xHis para su purificación. El gen que codifica para esta proteína fue sintetizado químicamente (Epoch Life Science Inc.) y se subclonó en el vector pET22b(+), entre los sitios *Nde*I y *Xho*I. Al plásmido resultante se le denominó pET22b-VP16H.

Para la propagación de este plásmido se transformaron células de *E. coli* DH10B electro-competentes, las cuales presentan ventajas frente a otras células para propagar plásmidos por su alta eficiencia de transformación, facilidad para su multiplicación y resistencia a plásmidos potencialmente tóxicos para la célula.

---

---

Protocolo: Transformación de células electro-competentes.

---

---

1. El plásmido contenido en papel filtro se hidrató con 50  $\mu$ L de agua destilada estéril. Se agitó durante 5 min y se dejó reposar durante 30 min. Una vez transcurrido el tiempo, se centrifugó 1 min a 10,000 rpm, se retiró el papel filtro.
2. Las células de *E. coli* DH10B electro-competentes se retiraron del congelador a -70° C, teniendo cuidado de manejarlas siempre en baño de hielo.
3. Se adicionaron 2  $\mu$ L del plásmido a las células de *E. coli* DH10B electro-competentes.
4. Inmediatamente se colocaron las células en una celda de electroporación fría, de 2 mm de separación entre placas, y se procedió a dar el pulso eléctrico en un electroporador con las condiciones preseleccionadas: 2.5 kV.
5. Para recuperar las células se adicionaron 500  $\mu$ L de medio LB a la celda de electroporación. La mezcla se decantó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se incubó a 37 °C durante 1 h.
6. Al finalizar la incubación, se inocularon 200  $\mu$ L de las células en agar LB-Amp (50  $\mu$ g/mL) usando perlas de vidrio estéril para promover la obtención de colonias

---

aisladas. Se dejaron incubar a 37 °C por 16 h. Adicionalmente se realizaron controles de las células competentes sin transformar en placas de LB, LB-Amp y LB-Kan incubando en las mismas condiciones.

---

### *Purificación del plásmido por mini-prep.*

El ADN plasmídico de las colonias aisladas se purificó para corroborar la presencia del gen de interés. La purificación se llevó a cabo por el protocolo de mini-prep.

---

#### Protocolo: Purificación ADN plasmídico.

---

1. Se seleccionaron las colonias que posteriormente se inocularon en medio líquido LB-Amp a 37 °C durante 16 h.
  2. Se centrifugaron 1.5 mL de las células de *E. coli* DH10B a 5000 rpm durante 10 min a 20 °C.
  3. Se decantó el medio y se resuspendió la biomasa en 100 µL de amortiguador 1 (500 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA y 5 mg/mL de lisozima).
  4. Se incubó a 37 °C durante 1 h.
  5. Posteriormente se adicionaron 200 µL de amortiguador 2 fresco (NaOH 0.2 M y 4% de SDS). Se incubó en hielo durante 10 min.
  6. Transcurrido el tiempo se adicionaron 150 µL de amortiguador 3 (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K 5 M, pH 5). Se mezcló e incubó en hielo durante 10 min.
  7. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min a 20 °C.
  8. Se recolectaron aproximadamente 400 µL del sobrenadante, el cual se colocó en un tubo Eppendorf nuevo. A este se le adicionaron 300 µL de fenol saturado con amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) frío. Se agitó suavemente.
  9. Posteriormente se adicionaron 300 µL de cloroformo y se agitó suavemente.
  10. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min a 20 °C.
  11. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se adicionó un volumen igual de isopropanol. Se mezcló suavemente. Para mejorar el rendimiento de precipitación de ADN se dejó a 4 °C durante 12 h.
  12. Para recuperar el ADN se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min.
  13. Se realizaron 2 lavados al ADN precipitado con etanol al 80%, hasta no lograr percibir el olor característico a fenol.
  14. Se decantó y se llevó a sequedad en una centrífuga a baja presión.
- 

### *Caracterización del vector pET22b-VP16H mediante digestión del plásmido.*

Debido a que el gen de VP1 fue clonado entre los sitios de restricción *Nde*I y *Xho*I, fue posible realizar una digestión con las enzimas específicas para estos sitios (Tabla. 1), para después poder observar en un gel de agarosa al 1% la presencia del vector pET22b(-) y el gen de la proteína VP1.

Tabla. 1. Mezcla para la reacción enzimática para la liberación del gen de VP1.

Reactivos	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Enzima de restricción <i>NdeI</i>	2.5 $\mu\text{L}$
Enzima de restricción <i>XhoI</i>	2.5 $\mu\text{L}$
BSA 10x	5.0 $\mu\text{L}$
Amortiguador NEB 3.1	5.0 $\mu\text{L}$
Agua destilada	25 $\mu\text{L}$

---



---

Protocolo: Digestión enzimática del plásmido pET22b-VP16H.

---

1. Se resuspendió el plásmido en 10  $\mu\text{L}$  de amortiguador EB (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0). Se tomó 1  $\mu\text{L}$  y se mezcló con 4  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción enzimática.
  2. Se incubó durante 50 min a 37 °C para promover el corte de las enzimas de restricción.
  3. Una vez transcurrido el tiempo se agregaron 2  $\mu\text{L}$  de amortiguador de carga para electroforesis.
  4. Del plásmido resuspendido en EB se tomó 1  $\mu\text{L}$  y se le adicionaron 2  $\mu\text{L}$  de amortiguador de carga.
  5. Se realizó la electroforesis tanto para las muestras digeridas como para las intactas, además del marcador de peso molecular para ADN (2log DNA ladder BisLabs) en un gel de agarosa al 1%.
  6. Al finalizar la electroforesis se tiñó el gel con bromuro de etidio durante 15 min. Se observó en el trans-iluminador de luz UV.
- 

*Transformación de células E. coli BL21(DE3) electro-competentes.*

Una vez que se propagó el plásmido, garantizando que se tendrá reservas para todo el proyecto, se continuó con la transformación de células de *E. coli* que permitan la sobreexpresión de la proteína VP1, para lo que se usó la cepa BL21(DE3) electro-competente.

---



---

Protocolo: Transformación de células *E. coli* BL21(DE3) electro-competentes.

---

1. El plásmido propagado se rehidrató en 10  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril.
  2. Para la transformación se tomó 1  $\mu\text{L}$  del plásmido. Se siguió el mismo procedimiento que para la transformación de *E. coli* DH10B electro-competente.
-

---

*Inducción de la expresión de la proteína VP1.*

El gen de la proteína VP1 está bajo el promotor T7, que adicionalmente contiene un operador *lac*. Esto permite utilizar un inductor artificial como el IPTG, permitiendo que la RNAPol de T7, cuya expresión es regulada también por el operador *lac*, se una al promotor T7 y transcriba el gen con alta eficiencia. Antes de realizar el escalamiento de la producción de VP1 se hizo una prueba de sobreexpresión para corroborar condiciones experimentales.

---

---

Protocolo: Inducción de la expresión de VP1.

---

---

Se partió de las colonias aisladas de *E. coli* BL21(DE3) obtenidas con el plásmido propagado.

1. Una colonia se inoculó en 10 mL de medio LB-amp. Se dejó incubar a 37 °C durante 6 h.
2. Se tomó una alícuota de 500 µL como control.
3. Se adicionó una concentración final de 0.25 mM de IPTG.
4. Se dejó incubar a 37 °C durante 16 h.
5. Se tomó una alícuota de 500 µL.
6. Las muestras anteriores y posteriores a la inducción se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 min.
7. Se decantó el sobrenadante y la biomasa fue resuspendida en 100 µL de agua destilada.
8. De estas muestras, para corroborar la sobreexpresión, se realizó una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

---

Una vez corroborada la sobreexpresión de VP1 se procedió al escalamiento a 1 L de medio de cultivo.

---

---

Protocolo: Escalamiento de la producción de VP1 a 1 L de medio de cultivo.

---

---

Para este procedimiento se partió de las colonias aisladas de la transformación de *E. coli* BL21(DE3).

1. Se inoculó una asada de una colonia aislada en 10 mL de medio LB-amp. Se incubó a 37 °C durante 16 h con agitación orbital a 220 rpm.
  2. Los 10 mL se trasvasaron a un matraz Erlenmeyer bafleado, con 100 mL de medio LB-amp. Se incubó a 37 °C durante 5 h con agitación orbital a 220 rpm.
  3. Se trasvasaron los 110 mL de agar a un matraz Erlen-Meyer con 1 L de medio de cultivo LB-amp, se tomó 1 mL del medio como blanco.
  4. Se incubó a 37 °C hasta alcanzar la fase exponencial a una  $D.O_{600nm} = 0.5$  (~1.5 h).
-

5. Una vez alcanzada la fase exponencial, se adicionó IPTG (0.25 mM concentración final) y se incubó a 37 °C durante 16 h con agitación orbital de 220 rpm. Se corroboró la sobreexpresión mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE.
6. La biomasa fue recuperada centrifugando a 5000 rpm por 20 min a 10 °C.
7. Se realizaron 2 lavados con 100 mL de solución salina (NaCl 150 mM) centrifugando en iguales condiciones.
8. Por último, se resuspendieron las células en 50 mL de solución salina (NaCl 150 mM) y se guardó a -70 °C.

---

### *Limpieza de los cuerpos de inclusión.*

En trabajos previos [35, 36, 41, 43] se describe la formación de cuerpos de inclusión por la proteína VP2 y otras proteínas quiméricas basadas en la proteína VP2. Debido a que VP1 y VP2 comparten la región mayoritaria VP este fenómeno siguió ocurriendo. El protocolo utilizado para la limpieza de los cuerpos de inclusión es el reportado por Santillán-Urbe, 2017 [43].

---

#### Protocolo: Limpieza de cuerpos de inclusión.

---

1. Se descongeló la biomasa empleando un baño de agua a 25 °C y se recuperaron las células centrifugando durante 15 min a 8000 rpm a 5 °C.
  2. La biomasa recuperada fue resuspendida en 25 mL de solución amortiguadora A<sub>LCI</sub> (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.0). Y recuperada por centrifugación en las condiciones descritas.
  3. Las células recuperadas fueron resuspendidas en 40 mL de solución amortiguadora B<sub>LCI</sub> (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2% v/v Tritón 100x, pH 8.0). Una vez resuspendidas las células se procedió a sonicarlas mediante un ciclo de 20 min, con pulsos de 10 s y pausas de 10 s. Todo esto empleando baño de hielo.
  4. El producto de la lisis celular se centrifugó a 8000 rpm durante 20 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante.
  5. Se realizó un lavado de los cuerpos de inclusión obtenidos solubilizándolos en 40 mL de solución amortiguadora B<sub>LCI</sub> y sonicando nuevamente en un solo ciclo de 10 min con pulsos de 10 s y pausas de 10 s.
  6. La suspensión obtenida se centrifugó a 10,000 rpm durante 40 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se continuó con la fracción insoluble.
  7. El precipitado obtenido se solubilizó en 50 mL de solución amortiguadora C<sub>LCI</sub> (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3 M NaCl, 2 mM DTT, 6 M GndHCl, pH 6.3). De esta manera se conservó en un tubo falcón a temperatura ambiente hasta comenzar la etapa de purificación.
-

*Purificación de la proteína VP1 mediante cromatografía de afinidad a Níquel.*

La proteína VP1 está provista de una etiqueta con 6 residuos de Histidina que se localizan en el extremo C-terminal. Esta característica permite su purificación por cromatografía de afinidad, utilizando resina cuya matriz contiene iones níquel, el cual es afín a los anillos de imidazol de los residuos Histidina. El protocolo utilizado se desarrolló con base en un trabajo previo donde se purificaron proteínas quiméricas de VP2 [43].

---

Protocolo: Purificación por cromatografía de afinidad a iones Ni.

---

La columna empleada fue empacada con resina Protino<sup>®</sup> Ni-TED y posee un volumen de columna de 15 mL. Su funcionamiento depende de la gravedad.

1. La matriz de la columna fue equilibrada con 30 mL de solución amortiguadora A<sub>EQ</sub> (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3 M NaCl, 2.5% v/v glicerol, pH 7.5).
2. Cuando la solución A<sub>EQ</sub> estaba por terminarse se adicionaron al reservorio 20 mL de la solución amortiguadora A<sub>PU</sub> (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3 M NaCl, 3 M GndHCl, 2.5% v/v glicerol, pH 7.5).
3. Inmediatamente después de que terminó de pasar la solución A<sub>PU</sub> se adicionaron 7.5 mL de la solución de cuerpos de inclusión solubilizados.
4. Casi finalizado el paso de los cuerpos de inclusión por el reservorio, se adicionaron 20 mL de solución amortiguadora B<sub>PU</sub> (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3 M NaCl, 3 M GndHCl, pH 7.5).
5. Cuando la solución B<sub>PU</sub> estaba por concluir su paso por el reservorio se agregaron 20 mL de la solución amortiguadora C<sub>PU</sub> (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3 M NaCl, 3 M GndHCl, 15 mM Imidazol, pH 7.5).
6. Antes de que el amortiguador C<sub>PU</sub> terminara su paso por el reservorio se adicionaron 15 mL de solución amortiguadora D<sub>PU</sub> (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3 M NaCl, 3 M GndHCl, 30 mM Imidazol, pH 7.5).
7. Cuando la solución D<sub>PU</sub> estaba por terminar su paso por el reservorio, se adicionaron 10 mL de la solución amortiguadora E<sub>PU</sub> (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 M NaCl, 3 M GndHCl, pH 7.5).
8. Finalmente, antes de que el amortiguador E<sub>PU</sub> terminara su paso por el reservorio, se adicionaron 30 mL de la solución amortiguadora F<sub>PU</sub> (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3 M NaCl, 3M GndHCl, 350 mM Imidazol, pH 7.5). Inmediatamente se comenzó a recolectar el volumen muerto (10 mL).
9. Terminando de recolectar el volumen muerto se comenzó a coleccionar la proteína de interés en 6 fracciones de 5 mL cada una.
10. Para finalizar el ciclo de purificación, se adicionaron 70 mL de agua destilada al reservorio.
11. Se analizaron las fracciones 1, 4 y 6 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE para comprobar la pureza de las fracciones.
12. Aquellas fracciones que presentaban iguales condiciones de pureza se concentraron utilizando unidades de filtración Amicon<sup>®</sup> con un límite de peso molecular de 50 kDa.
13. Una vez concentrada la proteína se realizó el cambio de la solución amortiguadora F<sub>PU</sub> por la solución amortiguadora denominada G<sub>PU</sub> (20 mM Tris-HCl, 0.150 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM de DTT, 5 M GndHCl, pH 8) utilizando la misma unidad

Amicon®. Con este cambio de amortiguador se busca eliminar el imidazol presente y conservar a la proteína en condiciones apropiadas para su posterior uso.

### *Determinación de la concentración de la proteína.*

La determinación de la concentración proteica se realizó por espectrofotometría a 280 nm, tomando como referencia una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) solubilizada en amortiguador G<sub>PU</sub>. Tanto las diluciones de la curva patrón como las diluciones de la muestra problema se realizaron por triplicado y bajo las mismas condiciones experimentales (Tabla. 2).

Tabla 2. Diseño experimental para la determinación de la concentración proteica.

Muestra	Vol. BSA 1 mg/mL ( $\mu$ L)	Concentración BSA (mg/mL)	Vol. amortiguador G <sub>PU</sub> ( $\mu$ L)	Vol. VP1 ( $\mu$ L)
<b>Blanco</b>	-	-	1000 $\mu$ L	-
<b>1</b>	50 $\mu$ L	0.05 mg/mL	950 $\mu$ L	-
<b>2</b>	200 $\mu$ L	0.2 mg/mL	800 $\mu$ L	-
<b>3</b>	400 $\mu$ L	0.4 mg/mL	600 $\mu$ L	-
<b>4</b>	600 $\mu$ L	0.6 mg/mL	400 $\mu$ L	-
<b>5</b>	800 $\mu$ L	0.8 mg/mL	200 $\mu$ L	-
<b>6</b>	1000 $\mu$ L	1.0 mg/mL	-	-
<b>M1</b>	-	-	990 $\mu$ L	10 $\mu$ L
<b>M2</b>	-	-	950 $\mu$ L	50 $\mu$ L
<b>M3</b>	-	-	900 $\mu$ L	100 $\mu$ L

### Protocolo: Determinación de la concentración proteica.

1. Se realizó una solución stock de BSA en amortiguador G<sub>PU</sub> (1 mg/mL).
2. La proteína VP1 se filtró a través de una membrana con tamaño de corte de 0.45 micras.
3. Todas las diluciones se prepararon en las mismas condiciones experimentales (Tabla 2).



4. Se determinó la absorbancia de cada muestra en el espectrofotómetro a 280 nm utilizando celda de cuarzo.
5. Con los valores obtenidos para las diluciones de BSA se construyó una curva patrón y por interpolación de las absorbancias para las muestras problema se determinó la concentración de VP1.

#### *Ensamble de proteínas para la obtención de VLPs.*

Al VP1 representar el 5% de la cápside viral del B19V, y teniendo en cuenta que la proteína estructural VP2 es capaz de formar cápsides sin la presencia de VP1, esta última ha sido poco estudiada en cuanto a su capacidad de formar VLPs estables. En estudios con baculovirus se demostró que VP1 es incapaz por si misma de formar VLPs eficazmente [55, 56], probablemente por el impedimento estérico provocado por los 227 AA. adicionales que presenta en su extremo N-terminal.

Sin embargo, su capacidad de auto ensamble no se ha evaluado en condiciones *in vitro*. Para evaluar su capacidad de generar VLPs se colocaron pruebas de ensamble con la proteína estructural VP1 (100%) así como ensambles en proporciones VP1/VP2 (1:1 M/M), VP1:VP2 (1:9 M/M) y VP2 (100%) como control [35, 36, 39, 43].

---

---

#### Protocolo: Ensamble de proteína

---

---

1. Se prepararon los tubos de diálisis de 1.5 mL, ajustando la concentración de proteína a 0.7 mg/mL utilizando amortiguador  $G_{PU}$  para llegar al volumen deseado para cada ensamble.
2. Se dializaron las muestras durante 40 h a 4 °C contra PBS-Arg (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM  $Na_2HPO_4$ , 2 mM  $KH_2PO_4$ , 0.2 M Arginina, pH 7.4).

#### *Caracterización de VLPs mediante DLS.*

La dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés) es una técnica hidrodinámica que puede ser empleada para determinar el perfil de la distribución de tamaño y masa que presentan algunos materiales en solución. Se usa principalmente para la caracterización de polímeros, micelas, carbohidratos, proteínas y nano partículas.

---

---

Protocolo: Caracterización de VLPs mediante DLS.

---

---

1. Una vez finalizada la diálisis las muestras se mantuvieron en hielo. Cada muestra se filtró a través de una membrana de 0.45 micras.
2. Posteriormente fueron filtradas por una membrana de 0.22 micras.
3. Se utilizó una celda de cristal con capacidad de 500  $\mu$ L para las mediciones.

Cada muestra fue analizada mediante 5 ciclos de 10 determinaciones por ciclo.

Las condiciones se fijaron en 1.33 para el índice de refracción, viscosidad de 1.003 cP y 20° C de temperatura.

---

*Purificación de VLPs mediante cromatografía de exclusión molecular.*

La cromatografía de exclusión molecular o de filtración en gel es una técnica de separación en la que la fase estacionaria está constituida por un polímero entrecruzado de tamaño de poro definido. Las moléculas grandes, no compatibles con el tamaño de poro, siguen su avance, mientras que las más pequeñas quedan retenidas en los intersticios de la matriz. Esta modalidad de cromatografía es útil para especies neutras de alto peso molecular, realizándose la separación en función de su tamaño, lo que permite separar las VLPs completamente formadas de intermediarios o agregados proteicos [57].

Para este análisis se utilizó un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución de la marca Waters. La columna utilizada fue empacada con la fase estacionaria denominada Sephacryl S-500 HR. Como fase móvil se utilizó solución amortiguadora PBS-Arg (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 M L-Arg, pH 7.4). El flujo de la fase preparativa se mantuvo en 0.5 mL/min y se utilizó un detector de UV-Vis ajustado a una longitud de onda de 280 nm para dar seguimiento al proceso de purificación. A partir del minuto 50 se empezó la recolección de las muestras, las de mayor absorbancia fueron analizadas posteriormente mediante DLS [36, 39, 43].

*Caracterización de VLPs mediante ultra-centrifugación isopícnica.*

En la centrifugación isopícnica las partículas son separadas en base a su densidad, el tamaño solo afecta la velocidad a la que las partículas alcanzan su posición isopícnica. Se lleva a cabo en un gradiente de densidad autogenerado, en el que las partículas se mueven hasta el punto en el que su densidad es la misma que la del medio, generalmente los tiempos de centrifugación son largos para lograr el equilibrio entre la fuerza centrífuga, el empuje hidrostático y la difusión, en la Figura 16 se observa el esquema de la ultra-centrifugación isopícnica [58].

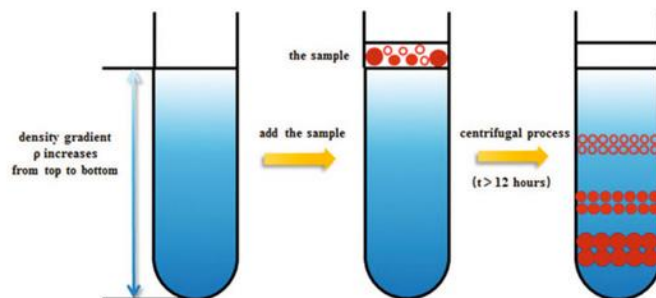


Fig. 16. Esquema de la centrifugación isopícnica. Tomado de Sun *et al.*, 2018.

Los gradientes continuos se autogeneraron a partir de una solución de CsCl con densidad de 1.33 mg/mL. Esto se logra a partir de una solución 2.4 M de CsCl llevada a aforo con la solución amortiguadora A<sub>GRA</sub> (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM EDTA, 0.5 % v/v Tritón X-100, pH 7.4), filtrada a través de una membrana de 0.45  $\mu$ m.

---

#### Protocolo: Caracterización de VLPs mediante Ultra-centrifugación Isopícnica

---

1. Una vez finalizada la diálisis para conseguir el ensamble, las muestras se mantuvieron en hielo. De cada muestra se tomaron 500  $\mu$ L que se analizaron mediante DLS corroborando que el ensamble finalizó correctamente.
  2. En cada tubo para centrifuga con capacidad de 5 mL (Ultra-Clear Beckman 11 x 60 mm) se colocaron 3.5 mL de la solución de CsCl.
  3. Posteriormente se adicionaron 500  $\mu$ L de las muestras con VLPs. Teniendo cuidado de mantener el gradiente generado.
  4. Los tubos y las camisas respectivos se balancearon con la proteína específica.
  5. El proceso de ultra-centrifugación se realizó empleando un rotor 60 Ti en un equipo Optima™ XL-100K Class S, ambos de la marca Beckman. Las condiciones se fijaron en 55,000 rpm a 20 °C durante 10 h y 45 min.
  6. Terminado el proceso, las bandas se recuperaron para medir su densidad y posterior caracterización mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE.
- 

#### *Caracterización de VLPs por microscopía de fuerza atómica (AFM).*

La microscopía de fuerza atómica (AFM por sus siglas en inglés) es reconocida como una versátil y poderosa herramienta analítica con potencial en diversas áreas de la biología. En la AFM la superficie de la muestra es escaneada mediante una aguda sonda y se visualiza la muestra a través de las fuerzas de atracción o repulsión en cada posición al aplicar un voltaje específico [59].

Las muestras se obtuvieron mediante diálisis durante 40 horas frente a solución amortiguadora PBS-Arg y fueron filtradas a través de una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  y posteriormente por 0.22  $\mu\text{m}$ . Las muestras fueron analizadas por DLS para estimar el estado del ensamble. Las muestras filtradas se llevaron a una dilución 1:1x10<sup>-9</sup> con PBS-Arg filtrado por una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ . Se colocó 1  $\mu\text{L}$  de la dilución en la superficie de un disco de mica grado V1 de 12 mm de diámetro (Ted Pella Inc.). Posteriormente las muestras se llevaron a sequedad en condiciones de presión reducida y temperatura de 25 °C. Para eliminar los cristales formados por la presencia de sales de las soluciones amortiguadoras se realizaron dos ciclos de limpieza con agua desionizada, previamente filtrada por una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ . Al final la mica fue adherida a un disco magnético. Los análisis se llevaron a cabo en un microscopio de sonda de barrido Innova™ (Veeco Instruments Inc.) que cuenta con una sonda de barrido de alta resolución Hi-Res-C19/Cr-Au (MikroMasch). Estas sondas tienen un radio de punta de 1 nm, constantes de fuerza promedio de 0.5 N/m y una media de frecuencias de resonancia de 65 kHz. Todas las imágenes fueron generadas utilizando el modo intermitente.

#### *Caracterización de VLPs mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM).*

La microscopía de transmisión electrónica (TEM por sus siglas en inglés) es una herramienta efectiva para visualizar la morfología y ultraestructura de especímenes tan pequeños que no pueden ser visualizados con las microscopias de luz convencionales. El TEM utiliza un bombardeo de electrones para visualizar muestras muy delgadas, los electrones interactúan con la muestra que es enfocada por una lente que magnifica la imagen. Debido al hecho de que el TEM utiliza electrones y estos presentan mucho menor longitud de onda que la luz visible la resolución es mucho mayor que el microscopio de luz convencional. Las regiones donde la muestra bloquea los electrones se observan con apariencia negra mientras que las regiones donde los electrones atraviesan tienen una apariencia blanca. En viriones, la falta de densidad electrónica permite el paso de los electrones, ya que estos, no pueden interactuar con la muestra. Por esta razón la tinción negativa es el método más usado para la observación de viriones mediante TEM [60].

Las muestras se obtuvieron mediante diálisis durante 40 horas frente a solución amortiguadora PBS-Arg, posteriormente fueron filtradas a través de una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  seguido de una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ . Las muestras se llevaron a una dilución 1:100 con amortiguador PBS-Arg. Se colocaron 20  $\mu\text{L}$  de la muestra sobre la rejilla cubierta con formvar, se dejó impregnar la muestra durante 5 min. Pasado el tiempo se retiró el exceso con papel filtro y se colocaron 20  $\mu\text{L}$  de ácido fosfotúngstico, el cual se dejó 5 segundos y se retiró el exceso con papel filtro. Las rejillas se dejaron secar durante 12 horas. Las lecturas se realizaron en un

microscopio de transmisión electrónica JEOL JEM-ARM200F con un voltaje de 200 kV.

*Determinación de la actividad catalítica de PLA<sub>2</sub> perteneciente a VP1u mediante cromatografía en placa fina (TLC).*

Una manera indirecta de corroborar que la región N-terminal de VP1 se encuentra externalizada y correctamente plegada en las VLPs que la contienen es observando la actividad de fosfolipasa tipo 2 que presenta intrínsecamente la VP1u.

El ensayo se llevó a cabo en 858  $\mu$ L de amortiguador A<sub>ACT</sub> (Tris-HCl 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Tritón X-100 2 mM, pH 7.5) utilizando 476  $\mu$ L de VLPs de VP2 100% (Control negativo), VP1 100%, VP1:VP2 (1:9 M:M) y VP1:VP2 (1:1 M:M) a una concentración aproximada de 0.7 mg/mL, la reacción se inició adicionando a la mezcla 666  $\mu$ L del sustrato en cloroformo a una concentración de 15 mM, como sustrato 1-palmitoil-2-oleoil-3-fosfatidilcolina (FC). La reacción se incubó a 37 °C durante 1 hora, tras lo cual se realizó una cromatografía en capa fina (TLC) usando como fase móvil cloroformo-metanol-amoniaco (65:35:5). Revelando posteriormente en cámara con vapores de yodo.

*Determinación de la hemólisis generada en RBC por acción de la PLA<sub>2</sub> de VP1.*

Como se ha mencionado anteriormente, el incorporar VP1 a las VLPs del B19V proporcionaría la entrada a las células blanco. Sin embargo, al incrementar la concentración de VP1, para hacer más eficiente el tránsito celular, su actividad de fosfolipasa tipo 2 intrínseca podría causar lisis celular. Por este motivo se realizó una prueba de lisis en eritrocitos (RBC) con las VLPs anteriormente caracterizadas.

La prueba se realizó en eritrocitos, ya que se conoce que son células permisivas, por contener los receptores necesarios para la internalización. Sin embargo, también se sabe que hay cierta población que no contiene el antígeno P. Por este motivo se utilizaron tres muestras sanguíneas diferentes para reducir la incertidumbre.

Una manera indirecta de conocer el grado de hemólisis de los eritrocitos es mediante la cuantificación de la hemoglobina liberada, medida a 540 nm en el espectrofotómetro. Para este objetivo se implementó una variante de la prueba clínica: fragilidad osmótica. La fragilidad osmótica en eritrocitos indica la resistencia de estos a la ruptura por acción de la presión osmótica, ejercida sobre la membrana eritrocitaria, al colocarlos en soluciones salinas hipotónicas [61].

---

Protocolo: Actividad catalítica de PLA2 en RBC mediante variante de fragilidad osmótica.

---

1. La sangre total heparinizada se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min; se desechó el plasma y el concentrado de eritrocitos se lavó tres veces con solución salina al 0.9 % NaCl pH 7.4.
2. Se preparó una suspensión de eritrocitos al 25% con la misma solución fisiológica, para cada una de las muestras.
3. Se preparó un stock de Amortiguador B<sub>ACT</sub> (NaCl 0.88% y CaCl<sub>2</sub> 2 mM pH 7.4), que en conjunto es una solución fisiológica, para realizar las diluciones pertinentes para la curva patrón de hemoglobina: 0.9, 0.7, 0.5 y 0.3%.
4. Para la construcción de la curva patrón de Hb se mezclaron suavemente 50 µL de la suspensión de eritrocitos con cada una de las soluciones de Amortiguador B<sub>ACT</sub> (0% hasta 0.9%). Se incubaron las muestras durante 1 h a 37 °C.
5. Posteriormente se centrifugó cada muestra a 2500 rpm durante 5 min, desechando el precipitado.
6. La absorbancia del sobrenadante se leyó a 540 nm frente al control negativo (solución salina al 0.9 %). El control positivo es la muestra incubada con 0 % de NaCl-CaCl<sub>2</sub> (agua destilada). Para cada punto se calculó el porcentaje de hemólisis.

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{\text{Abs } x\%}{\text{Abs } 0\%} * 100$$

Donde: Abs x%: representa el valor de absorbancia a 540 nm de las muestras a diferentes concentraciones de NaCl.

7. Para las muestras con VLPs además de los 50 µL de suspensión de eritrocitos se colocaron 200 µL de VLPs (0.7 mg/mL) y amortiguador B<sub>ACT</sub>. Incubando 1 hora a 37 °C.

En la Tabla. 3 se especifican las condiciones de la curva patrón y de las muestras con VLPs.

Fue necesario usar CaCl<sub>2</sub> en el ensayo por la dependencia de Ca<sup>+2</sup> por parte de la PLA<sub>2</sub> presente en la región única de VP1.

---

Tabla. 3: Condiciones de la prueba de actividad catalítica de PLA2 de las VLPs en RBC.

Muestra	Vol. NaCl-CaCl <sub>2</sub> (308 Osm)	Vol. RBC al 25 %	Vol. H <sub>2</sub> O	Vol. VLPs
0.9 %	2000 µL	50 µL	-	-
0.7 %	1555 µL	50 µL	445 µL	-
0.5 %	1111 µL	50 µL	889 µL	-
0.3 %	660 µL	50 µL	1334 µL	-
0 % (agua destilada)	-	50 µL	2000 µL	-
VP2 100 %	1750 µL	50 µL	-	200 µL
VP2:VP1 (1:1)	1750 µL	50 µL	-	200 µL
VP1 100 %	1750 µL	50 µL	-	200 µL

#### Co-ensamble de VLPs con las proteínas VP1: VP2: ST-VP2.

Una vez comprobado que las VLPs que contienen VP1 no generan lisis celular se tuvo la tarea de generar VLPs que además de permitir el acceso a ciertos tipos celulares pudiesen ser susceptibles a ser localizadas mediante microscopía confocal. Por lo que se generaron VLPs que contuvieran además de VP1, la proteína quimérica SpyTag-VP2 (ST-VP2), la cual permitirá posteriormente funcionalizar las VLPs con la proteína quimérica verde fluorescente superfolder unida al péptido SpyCatcher (sfGFP-SC).

Las proteínas adicionales que se utilizaron en esta etapa del proyecto, al igual que las proteínas VP1 y VP2, fueron expresadas en *E. coli* BL21(DE3) a partir del plásmido pET22b (+), el cual incluía por separado las secuencias de ST-VP2 y sfGFP-SC [62].

En el grupo de trabajo se contaba con células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas con el plásmido de la proteína ST-VP2, por lo que únicamente se tuvo que sobre expresar y purificar mediante cromatografía de afinidad a iones níquel, ya que presentaba, al igual que las otras construcciones, con un His-Tag. Las condiciones de sobreexpresión y purificación fueron las mismas que para la proteína VP2 descritas en apartados anteriores [43]. En cuanto a la proteína sfGFP-SC se contaba con proteína purificada y cuantificada [62] por lo que solo se realizaron los cálculos para su implementación.



De esta manera se ajustó el protocolo para generar VLPs que contuvieran VP2, VP1 y ST-VP2. La presencia de VP2 en las VLPs que contengan el sistema SpyTag-SpyCatcher es fundamental, ya que el péptido SpyTag se ubica en el extremo amino terminal, compitiendo por la externalización por el poro en el eje de simetría de orden 5 con la proteína VP1, por lo que el tener solamente estas dos proteínas provocaría un impedimento estérico importante para la formación de VLPs funcionalizadas.

---

---

Protocolo: Ensamble de VLPs funcionalizadas con sGFP.

---

---

1. Se prepararon los tubos de diálisis de 1.5 mL, ajustando la concentración de proteína a 0.7 mg/mL utilizando amortiguador  $G_{PU}$  para llegar al volumen deseado para cada ensamble: VP1:VP2:ST-VP2 (10:65:25 %).
  2. Se dializaron las muestras durante 40 h a 4° C contra PBS 2X-Arg (274 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 20 mM  $Na_2HPO_4$ , 4 mM  $KH_2PO_4$ , 0.2 M Arginina, pH 7.4).
- 

Para corroborar la presencia de VLPs con las tres proteínas se realizó cromatografía de exclusión molecular, utilizando el sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución de la marca Waters, utilizando las condiciones anteriormente descritas, las fracciones de mayor absorbancia fueron analizadas posteriormente mediante DLS en las mismas condiciones ya mencionadas.

*Funcionalización de las VLPs mediante el sistema SpyTag/SpyCatcher.*

El sistema SpyTag-SpyCatcher es una de las opciones más eficientes de fusión génica en módulos que posteriormente pueden generar un enlace isopeptídico entre ellos con una alta estabilidad, lo que permite funcionalizar proteínas que no son compatibles en el proceso de producción y purificación.

En el grupo de laboratorio anteriormente ya se ha trabajado con este sistema, colocando tanto en el extremo N-terminal como en una de las asas más móviles de VP2, el péptido SpyTag sin observar modificaciones en la capacidad de auto ensamble de las VLPs. La funcionalización de las cápsides con fluoróforos, como la sfGFP o enzimas como la  $\alpha$ -glucosidasa se produce una vez que interactúan con las proteínas fusionadas con el péptido SpyCatcher, el cual no modificaba el correcto plegamiento de las proteínas de interés [38, 39].



---

Protocolo: Funcionalización del co-ensamble VP1:VP2:ST-VP2 con sfGFP-SC.

---

1. Una vez confirmada la presencia de partículas con un comportamiento hidrodinámico similar a las VLPs con VP1, se incubaron 400  $\mu$ L de las partículas con 5  $\mu$ L de sfGFP-SC [1.7 mg/mL].
  2. La incubación se realizó a 30 °C durante 3 h con agitación orbital.
  3. Las muestras posteriormente fueron concentradas en una centrifuga a baja presión y dializadas contra agua durante 16 horas.
  4. Se realizó un SDS-PAGE al 9% para visualizar de mejor manera la interacción de las proteínas.
- 

### *Caracterización de VLPs funcionalizadas con sGFP-SC por microscopía de fuerza atómica (AFM).*

Las muestras obtenidas de la caracterización por SEC y DLS que posteriormente fueron incubadas para la interacción de los péptidos SpyTag-SpyCatcher fueron diluidas  $1:1 \times 10^{-9}$  con PBS-Arg para su caracterización por AFM siguiendo las condiciones antes descritas.

### *Ensayos de unión e internalización celular en hepatocitos (línea celular HepG2).*

A pesar de que la infección del B19V está restringida a los precursores eritrocitarios, se ha observado la presencia de los viriones en otros linajes celulares [1, 3]. Dentro de estos linajes se encuentran los hepatocitos, por lo que la infección del B19V se ha asociado etiológicamente a la falla aguda fulminante del hígado (AFLF por sus siglas en inglés), la cual es una enfermedad fatal debida a infección hepática, intoxicación, o complicaciones por trasplante de hígado [63, 64].

Para estudiar la relación entre el parvovirus B19V y la AFLF diversos investigadores han usado la línea celular de hepato-carcinoma (HepG2), la cual se demostró que es un buen modelo, al presentar en su membrana los dos principales receptores sugeridos para la unión e internalización celular (Gb4Cer y la integrina  $\alpha 5\beta 1$ ) y es comparable con hepatocitos primarios [64, 65, 66]. Estas investigaciones en células HepG2 demostraron que, aunque la infección del B19V no es permisiva en este linaje celular, al no permitir la sobreexpresión de las proteínas estructurales de la cápside viral, la sobreexpresión de la proteína no estructural NS1 del virión induce la apoptosis celular por activación de las Caspasas 3 y 9 [65, 66].

Estos datos sugieren que el hígado puede ser un posible blanco para terapia usando las VLPs del B19V. Estos datos guiaron la decisión de usar la línea celular HepG2 como modelo para las VLPs que contienen VP1 en su estructura. El protocolo fue tomado de Cayetano-Cruz *et al.*, 2019 [62].

---

Protocolo: Ensayos de unión e internalización de VLPs con VP1:VP2:ST-VP2 funcionalizadas con sfGFP-SC en células HepG2.

---

1. Crecer las células HepG2 hasta una confluencia del 80% (aproximadamente 50,000 células por caja) adheridas en cubreobjetos dentro de cajas Petri de 35 mm, manteniéndolas en 2 mL de medio DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) durante 48 h a 37 °C.
  2. Pasado el tiempo adicionar 100 µg/mL de las VLPs tratamiento. Incubar nuevamente 1 h a 37 °C.
    - VLPs con VP1 (VP1:VP2:ST-VP2 15:55:30)/ sfGFP-SC
    - VLPs sin VP1 (VP2:ST-VP2 70:30)/ sfGFP-SC
    - PBS
  3. Lavar las células con 1 mL de PBS y adicionar 1 mL de medio de cultivo fresco.
  4. Incubar 2, 4 y 6 horas a 37 °C.
  5. Retirar el medio y lavar 2 veces con PBS-Tripsina al 0.05%.
  6. Lavar nuevamente con 1 mL de PBS.
  7. Fijar las células con 1 mL de paraformaldehído al 4% en PBS durante 15 min.
  8. Lavar 3 veces con 1 mL de PBS.
  9. Para la tinción de los núcleos celulares adicionar 25 µL de DAPI. Reposar durante 5 min.
  10. Lavar 3 veces con 1 mL de PBS.
  11. Antes de montar el cubreobjetos, colocar 1 gota de Vectashield en el portaobjetos previamente etiquetado y desengrasado.
  12. Sellar la preparación colocando esmalte en las orillas. Mantener las preparaciones cubiertas de la luz y a 4° C hasta la observación en el microscopio confocal.
-

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### *Análisis in silico de la VP1u para la obtención de un modelo tridimensional.*

La secuencia de la región única de la proteína VP1 fue sometida a análisis mediante diferentes servidores para lograr generar un modelo de su estructura terciaria que facilite el entendimiento de los sitios de relevancia de esta región. Los servidores utilizados fueron 1) ITASSER, el cual genera moldes basados en el PDB (Protein Data Bank) que luego, mediante simulaciones, logra integrar para generar el modelo, tomando en cuenta las características biológicas de cada proteína; 2) ROSETTA, el cual puede realizar la predicción de la estructura tridimensional *de novo* o por comparación con templados; y 3) el servidor QUARK, el cual, al igual que ROSETTA, se basa en un método *de novo* [48, 49, 50, 51, 52, 53].

En el caso de ITASSER y ROSETTA los 227 AA. de la VP1u se lograron analizar como un solo templado. Sin embargo, el servidor QUARK admite únicamente una longitud de 200 AA. por templado, por lo que se tuvo que dividir la secuencia en: los primeros 200 AA. y posteriormente del AA. 190 y hasta el 227 para construir un modelo completo. De cada servidor se escogieron los 2 modelos con la mejor puntuación. La Figura 17 muestra los 6 modelos obtenidos.

Como una medida para encontrar el modelo que mejor represente las características de la región única de VP1 se realizó un análisis comparativo de la integridad del dominio de PLA<sub>2</sub> de los seis modelos seleccionados contra las dos principales fosfolipasas que se tomaron como templado; recordando que, las VP1u de diversos parvovirus, únicamente comparten identidad con las sPLA<sub>2</sub> en el sitio catalítico y el asa de unión a Ca<sup>+2</sup> [3, 13].

ITASSER: Ambos modelos obtenidos toman como moldes las estructuras cristalográficas de fosfolipasas tipo 2 como la de humano (PDB POD1), la fosfolipasa del arroz (PDB 2WG7) y la fosfolipasa de abeja (PDB 1POC), adicionalmente el primer modelo, el cual presentaba un mejor valor de confianza, incluye como templados, proteínas de membrana y proteínas helicoidales recién descubiertas.

El modelo 1 (Fig. 17A) arroja como resultado un haz de 7 hélices  $\alpha$ , con un RMSD de 6.17 Å contra los aminoácidos del sitio catalítico de la fosfolipasa tipo 2 de humano (1POD) y 6.61 Å contra los aminoácidos del sitio catalítico de la 1POC. En cuanto al modelo dos, este se basa únicamente en estructuras de PLA<sub>2</sub>, presentando un RMSD de 2.59 Å contra los residuos equivalentes del sitio catalítico de la fosfolipasa 1POD y 2.67 Å contra los residuos del sitio catalítico de la

fosfolipasa 1POC. Sin embargo, para el resto de los residuos no se obtiene estructura secundaria definida (Fig. 17B).

ROBETTA: De los resultados obtenidos se eligieron los dos modelos con mayor valor de confianza, en este caso, el servidor realizó los modelos mediante comparación de secuencia, utilizando como moldes la PLA<sub>2</sub> de abeja (1POC), varios arreglos de la proteína estructural del VIH (PDB 4USN, 4D1K, 3DIK), una  $\beta$ -glucosidasa de *Pyrococcus furiosus* (PDB 3WQ8), una proteína clave en la fagocitosis de *Legionella pneumophila* (4ZUZ) y proteínas *de novo*.

En las figuras 17C y 17D se observan ambos modelos; el primer modelo presenta un RMSD de 8.51 y 8.17 Å contra los residuos equivalentes del sitio catalítico de la fosfolipasa de humano (1POD) y la PLA<sub>2</sub> 1POC respectivamente. Este modelo está compuesto por 4 hélices  $\alpha$  unidas por regiones largas y desordenadas. En cuanto al modelo 2, este presenta un RMSD de 13.07 y 7.61 Å contra los residuos del sitio catalítico de la PLA<sub>2</sub> de humano y de la 1POC, el modelo consta de 8 hélices  $\alpha$  con un arreglo claramente más laxo que los modelos anteriores, y en el cual es evidente la separación de dos dominios.

Por último, el servidor Quark arrojó 5 modelos *ab initio* de los cuales se seleccionaron los dos con mejores RMSD contra las dos fosfolipasas de referencia (1POD y 1POC). La figura 17E muestra un resultado parecido al segundo modelo obtenido mediante ROBETTA (Fig. 17D), con los dominios separados, este modelo está compuesto de 7 hélices alfa con RMSDs de 5.17 y 6.40 Å respecto a los aminoácidos equivalentes del sitio catalítico de las fosfolipasas de humano y abeja respectivamente. El último modelo (Fig. 17F) consta de un haz de 6 hélices  $\alpha$  y presenta RMSDs de 1.58 y 2.08 Å contra el sitio catalítico de la fosfolipasa 1POD y 1POC respectivamente.

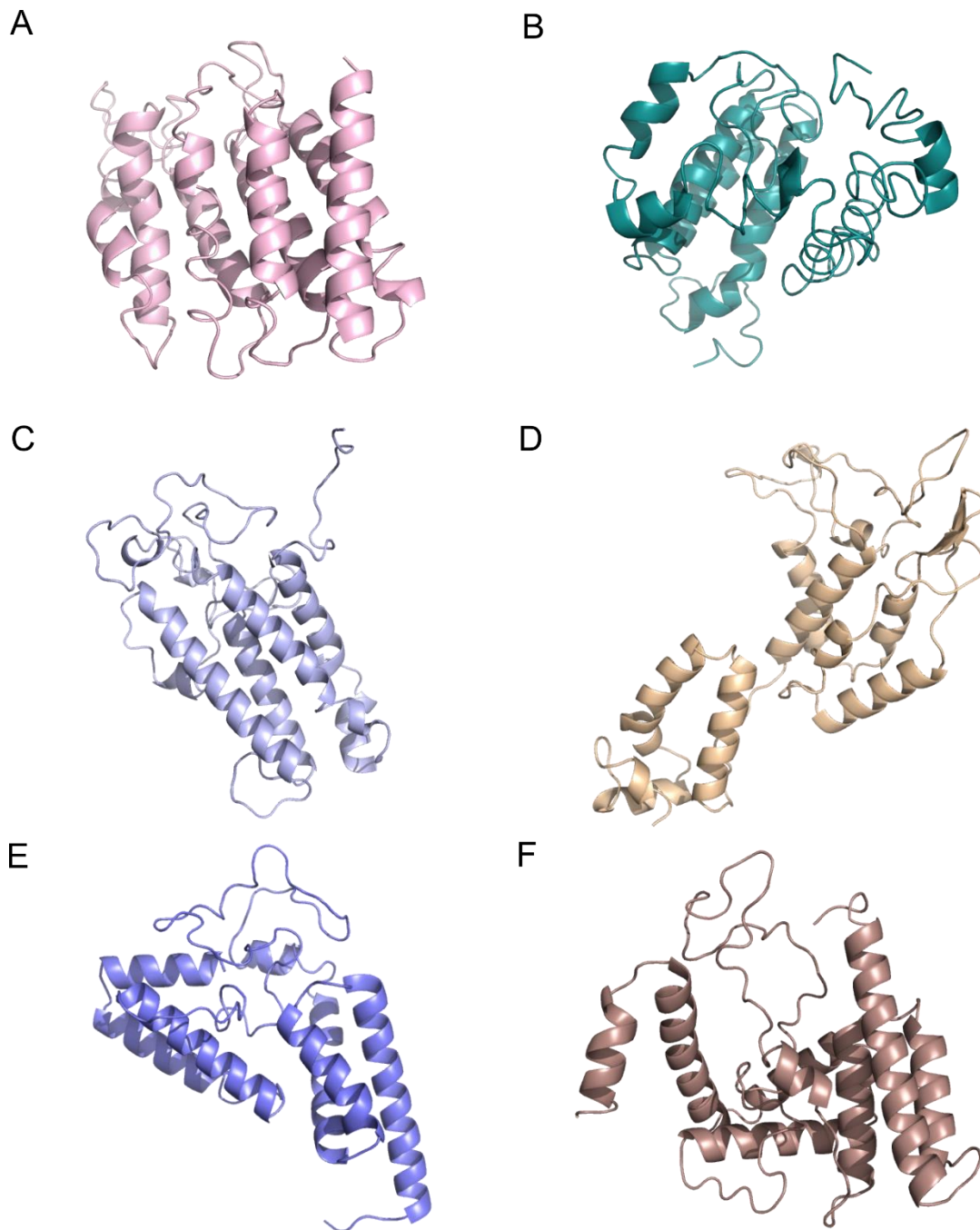


Fig. 17. Modelos de la región única de VP1 obtenidos mediante ITASSER, ROBETTA y Quark. A) Modelo 1 obtenido por ITASSER: presenta un RMSD de 6.17 Å contra los residuos del sitio catalítico de la fosfolipasa tipo de humano (1POD) y 6.61 contra los residuos equivalentes de la fosfolipasa de abeja (1POC). B) Modelo 2 obtenido por ITASSER: presenta un RMSD contra la 1POD de 2.59 Å y de 2.67 Å contra la 1POC. C) Modelo 3 obtenido por ROBETTA: con un RMSD de 8.51 Å contra los residuos del sitio catalítico de la fosfolipasa de humano y 8.17 Å contra la fosfolipasa de abeja. D) Modelo 4 obtenido por ROBETTA: presenta un RMSD de 13.07 Å contra la 1POD y 7.61 Å contra la 1POC. E) Modelo 5 obtenido mediante Quark: con RMSDs de 5.18 y 6.40 Å contra los aminoácidos del sitio catalítico de las fosfolipasas de humano y abeja respectivamente. F) Modelo 6 obtenido mediante Quark: presenta RMSDs de 1.58 y 2.07 Å contra el sitio catalítico de las fosfolipasas de humano y abeja respectivamente.

A continuación, los 6 modelos fueron sometidos a validación utilizando el servidor SAVES, en la Tabla 4 se muestran los valores relevantes de la comparación [54].

Tabla. 4. Evaluación de los modelos de la región única de VP1 (VP1u).

Modelo	RMSD vs 1POD (Å)	RMSD vs 1POC (Å)	Verify 3D	ERRAT	PROVE
Modelo 1	6.17	6.61	37.89% Rechazado	73.97	4.3% Advertencia
Modelo 2	2.59	2.67	63.88% Rechazado	62.55	3.6% Advertencia
Modelo 3	8.51	8.17	84.14% Aprobado	93.95	5.3% Error
Modelo 4	13.07	7.61	87.67% Aprobado	92.20	4.0% Advertencia
Modelo 5	5.18	6.40	93.50 Aprobado	82.29	8.0% Error
Modelo 6	1.58	2.07	83.50 % Aprobado	88.02	9.9% Error

Dentro de los parámetros a evaluar encontramos el “Verify”, el cual determina la compatibilidad del modelo atómico 3D con su secuencia de aminoácidos (1D), mediante la asignación de clases estructurales, basadas en la localización y entorno de cada aminoácido (hélices alfa, hojas beta, asas, residuos polares o no polares, etc.) comparando los resultados con estructuras ya cristalizadas. Por lo que es uno de los parámetros con mayor importancia en la validación [54].

El parámetro ERRAT analiza las estadísticas de las interacciones no covalentes entre los diferentes tipos de átomos y traza el valor de la función de error contra la posición de una ventana de 9 residuos, calculada mediante una comparación con estadísticas de estructuras altamente refinadas. Los gráficos de este parámetro para cada modelo se observan en la Figura 18 [54].

Por último el parámetro PROVE calcula el volumen de los átomos en las macromoléculas y las estadísticas de la desviación del Z-score contra las de modelos con alta resolución (menor a 2.0 Å) y bien refinados (R-factor de 0.2 o mejor) encontrados en el PDB, teniendo que, un modelo es aprobado por abajo del 1%, el modelo tiene advertencia de error entre el 1 y el 5% y marca un error por arriba del 5% [54]. Aunque es un parámetro por considerar para la validez del modelo, de los tres es el que menor peso agrega.

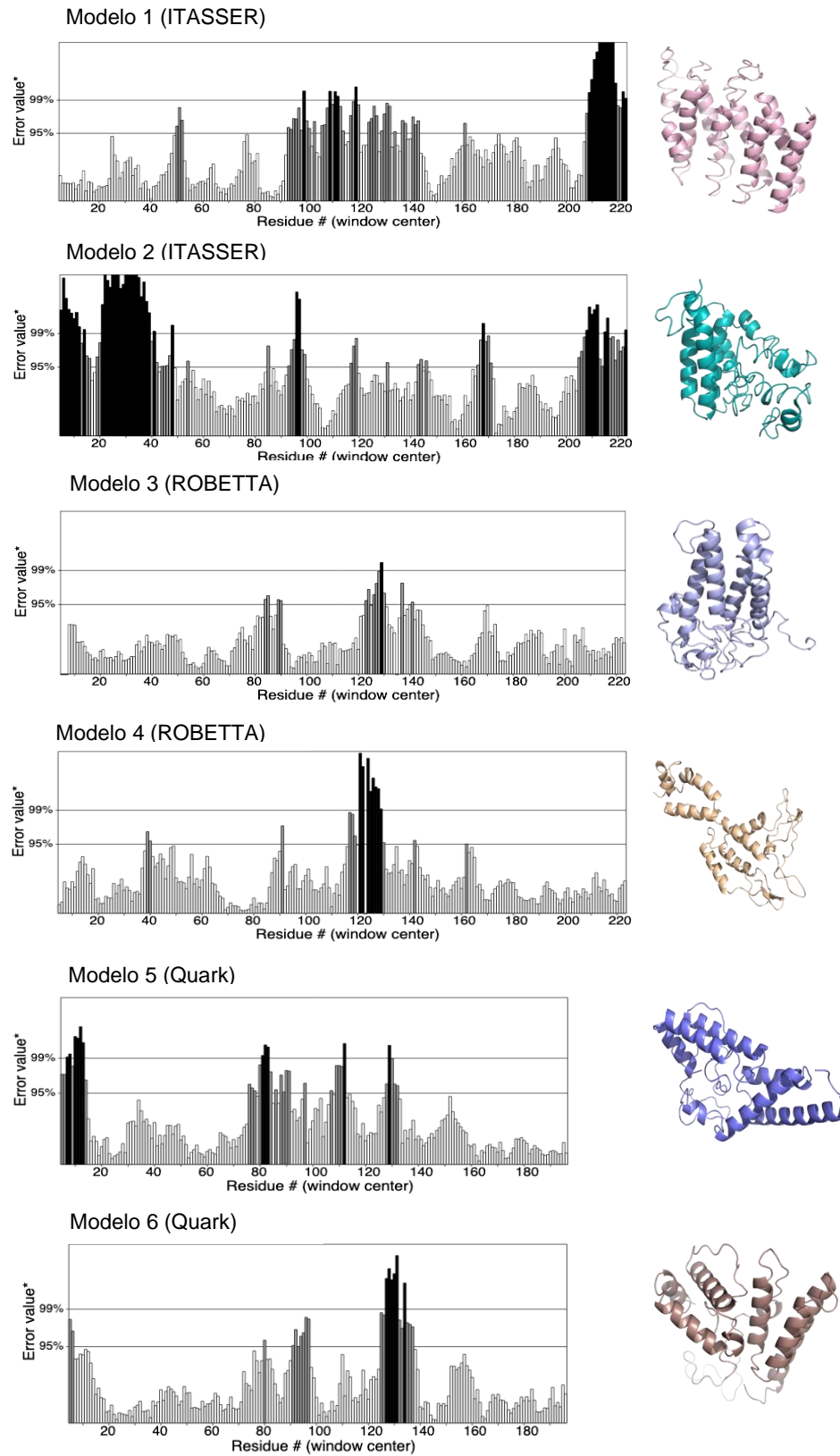


Fig. 18. Comparación de los gráficos de ERRAT de los 6 modelos propuestos para la región única de VP1.



Como se mencionó anteriormente el equipo de Leisi, en 2016 utilizó el servidor Quark para generar un modelo de la VP1u que pudiera explicar o ayudar a entender por qué la unión e internalización del B19V se ve afectada al truncar o modificar la región entre los residuos 5 y 80 [16]. Su modelo fue generado utilizando la secuencia de la región única de VP1 del aminoácido 1 al 101, esta secuencia arrojó la formación de 3 hélices  $\alpha$ : hélice 1 (AA. 14-31), hélice 2 (AA. 35-45) y hélice 3 (AA. 59-68) [16], las demostraron son de relevancia tanto para la unión como la internalización de la región a las células blanco [16].

Teniendo esta información en cuenta, un parámetro más a evaluar para los modelos generados por ITASSER, ROBETTA y Quark fue la presencia de las 3  $\alpha$  hélices (Fig. 19).

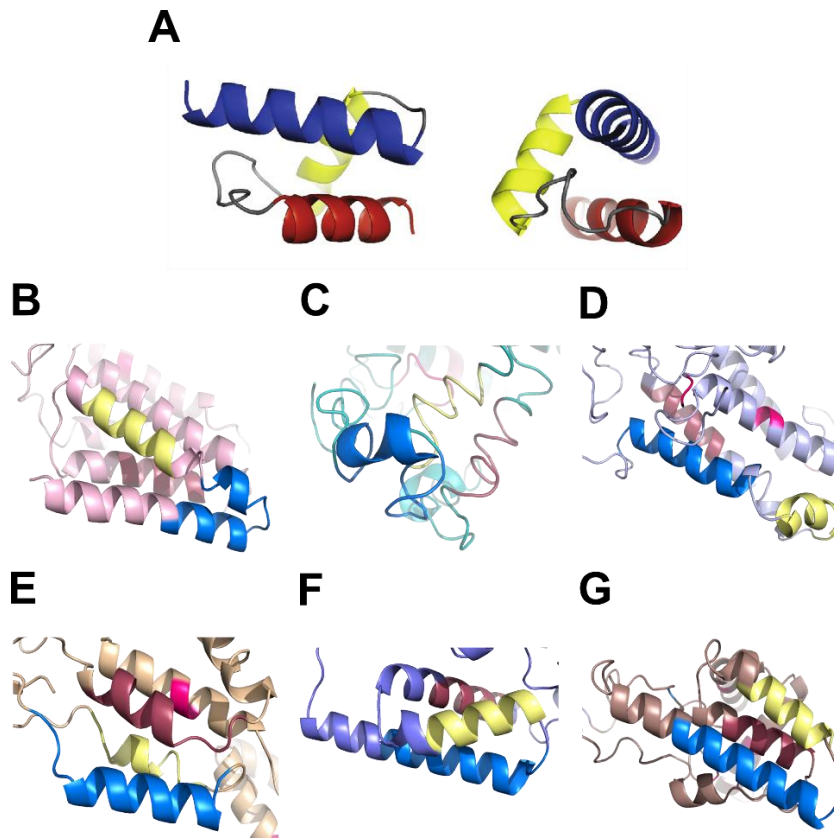


Fig. 19. Visualización de las 3 hélices alfa propuestas por Leisi en 2016. A) Imagen tomada de Leisi. R. et al 2016, donde se aprecia en azul la hélice 1, en amarillo la hélice 2 y en rojo la hélice 3. B-G acercamiento a los aminoácidos que forman las hélices propuestas por Leisi en 2016 en los seis modelos obtenidos por ITASSER, ROBETTA y Quark. En azul la hélice 1, en amarillo la hélice 2 y en rojo la hélice 3.



Como se puede observar, los únicos dos modelos que no contemplan la integridad de las tres alfa hélices (Fig. 19B y 19C), principalmente de la primera que es la de mayor relevancia, son los generados a partir de ITASSER, especialmente el modelo 2, por lo que para fines de encontrar un modelo que respete todos los sitios relevantes para el ciclo de replicación del B19 esos dos modelos se descartan.

De los modelos restantes, los modelos 3, 5 y 6 (Fig. 19D, 19F y 19G) son los que mejor se adaptan a la integridad de las hélices  $\alpha$ . De entre estos tres, el de mejor puntuación en la validación es el 3, sin embargo, justamente es el modelo que presenta un RMSD más alto contra las dos fosfolipasas de referencia, presentando el sitio activo completamente desplegado, además de presentar el tripéptido RGE de unión a la integrina oculto (Fig. 20A). Es posible que este modelo represente la conformación nativa en el virión, antes de que se establezca la primera interacción con los receptores celulares para posteriormente dar lugar a la conformación capaz de unirse a la integrina  $\alpha 5\beta 1$  y que presente la actividad de PLA<sub>2</sub> necesaria para la liberación de los viriones del lisosoma.

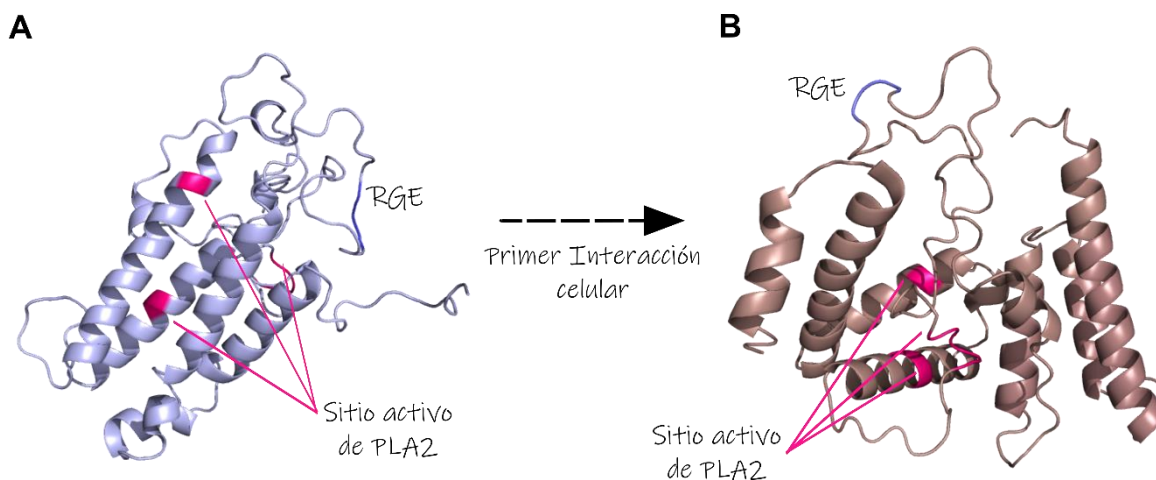


Fig. 20. Comparación entre el modelo 3 obtenido con ROBETTA (A) y el modelo 6 obtenido mediante QUARK (B). Se resalta en rosa los aminoácidos pertenecientes al sitio activo con actividad de fosfolipasa tipo 2, y en morado el tripéptido de unión a la integrina  $\alpha 5\beta 1$ , la cual es clave en la internalización celular

Entre los modelos 5 y 6, el modelo 5 es el que presenta mejores puntajes en la validación, sin embargo, el modelo 6 tiene mejores RMSD contra ambas fosfolipasas, puntajes aceptables en cuanto a calidad y presenta el tripéptido de unión a la integrina accesible (Fig. 20B) por lo que fue el modelo elegido para representar la estructural de VP1u en su forma activa.

La comparación entre los sitios de interés de los modelos 3 y 6 se muestra en la Figura 20, resaltando que es posible que exista una transición del modelo 3 al 6 una vez que se da el primer contacto con la superficie celular. Es importante recordar que, el sitio de unión a receptor propuesto por Leisi se encuentra muy próximo al N-

terminal. Esto podría corroborar que una vez que se da la interacción con el dominio de unión a receptor (hélices  $\alpha$ ), suceda un cambio conformacional que externalice el dominio RGE para la unión a la integrina y que adicionalmente pliegue correctamente el sitio activo para su posterior uso en el lisosoma.

La Figura 21 muestra el modelo completo de la región única de VP1 seleccionado, resaltando el dominio de unión a la integrina  $\alpha 5\beta 1$  (RGE), el sitio activo de PLA<sub>2</sub> y el sitio de unión propuesto por Leisi y colaboradores en 2016.

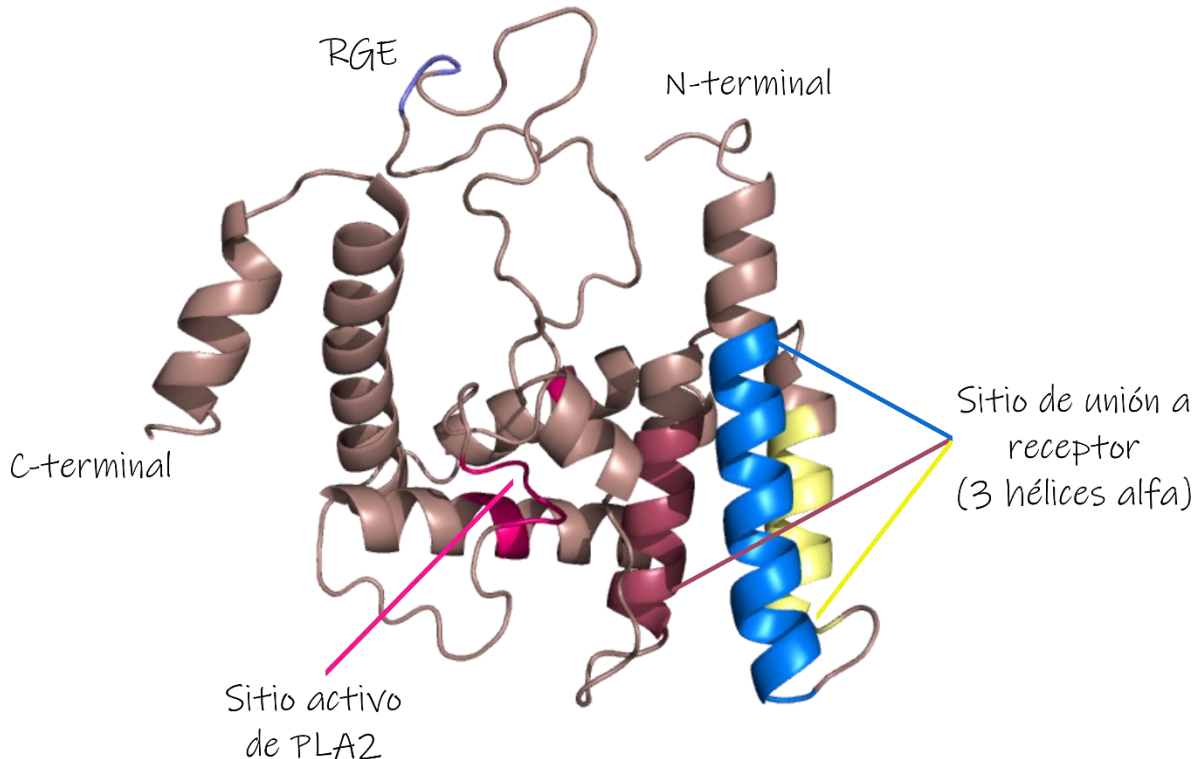


Fig. 21. Modelo tridimensional de la región única de VP1. Se resaltan en rosa el dominio catalítico de fosfolipasa tipo 2, en 3 hélices (roja, amarilla y azul) el dominio de unión a receptor (RBD). En lila se muestra el tripéptido de unión a integrina (RGE). Además, es posible observar los extremos amino y carboxilo terminales.

Este modelo nos servirá como referencia, únicamente ilustrativa, de las regiones que tienen que estar correctamente plegadas para que las partículas que contienen VP1 en su estructura presenten actividad de PLA<sub>2</sub> y tengan la capacidad de unirse e internalizarse en la línea celular HepG2.

Es importante no perder de vista que, al tener diferentes modelos con buenos puntajes en la validación y con la presencia del dominio de unión a receptor propuesto en 2016, la idea de que la región única del parvovirus B19 adopta diferentes conformaciones durante el proceso de internalización es plausible. Por lo

que, probablemente la VP1u durante el ciclo de replicación del virus, presente alguna de las conformaciones arrojadas por los servidores utilizados.

*Transformación, purificación y digestión enzimática del plásmido pET22b-VP16H.*

El vector utilizado para expresar la proteína fue el pET22b (+), que cuenta con 5493 pb. El gen de la proteína VP1 se encuentra localizado entre los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI*. El plásmido con el gen de la proteína VP1, pET22b-VP16H, se muestra en la Figura 22.

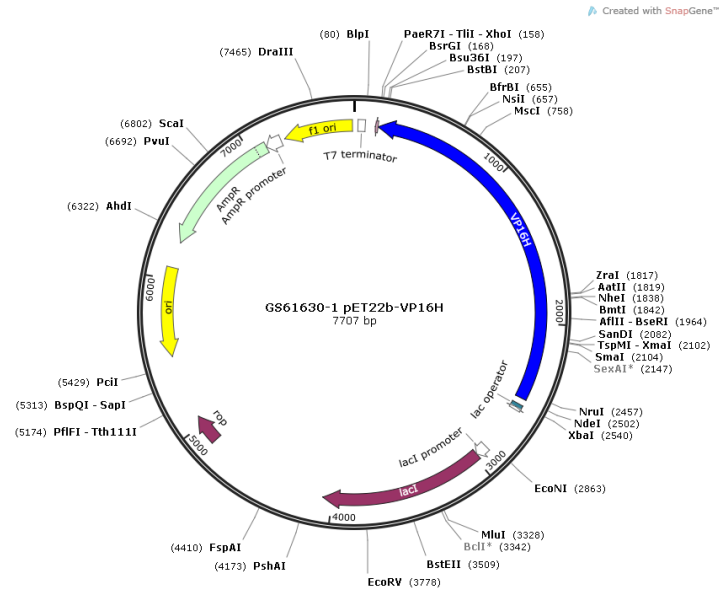


Fig.22. Plásmido pET22b-VP16H.

Teniendo en cuenta que el vector completo, incluyendo al gen de interés, cuenta con 7707 pb, que el gen que codifica para VP1 es de 2343 pb al realizar una digestión enzimática entre los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI* se obtuvieron dos fragmentos: el equivalente al gen para VP1 (2343 pb) y el correspondiente al resto del vector (5364 pb) fácilmente distinguibles por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Fig. 23).

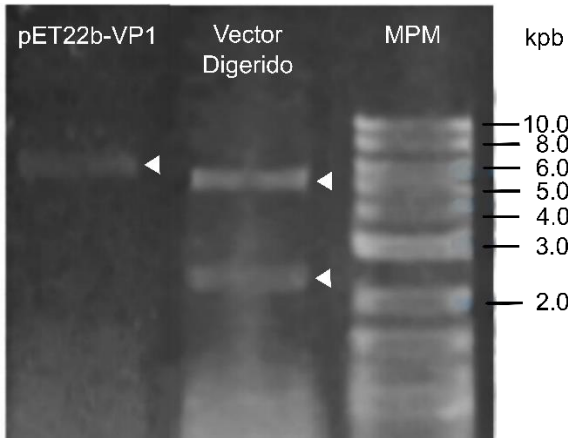


Fig. 23 Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1: Vector pET22b-VP1 antes de la digestión con enzimas de restricción. Carril 2: Vector pET22b-VP1 después de la digestión enzimática con las enzimas *NdeI* y *XhoI*. Carril 3: marcador de peso molecular (2log DNA ladder BisLabs).

Como se puede observar en la Figura 23, el análisis de restricción del gen de la proteína VP1, mediante su liberación del vector pET22b (+), fue exitoso. En el carril 1 se observa una única banda definida de entre 6 y 8 kpb, valor esperado para el vector completo (7707 pb), en el carril 2 se observan dos bandas: una de entre 5 y 6 kpb y otra de entre 2 y 3 kpb, correspondientes al vector pET22b (+) y al gen de la proteína VP1 respectivamente.

*Transformación de células de E. coli BL21(DE3) e inducción de la expresión.*

La sobreexpresión de la proteína VP1 se reguló mediante la adición de un inductor artificial como lo es el IPTG, se comprobó la sobreexpresión de VP1 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% SDS-PAGE (Fig. 24).

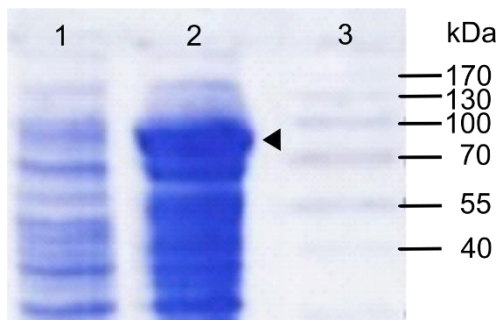


Fig.24. A) Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% para la inducción proteica. Carril 1: Lisado celular de *E. coli* en fase exponencial. Carril 2: Lisado celular de *E. coli* a 16 h de adicionar el inductor IPTG. Carril 3: Marcador de peso molecular (Bluestar Prestained Protein Marker).

La Figura 24 muestra la sobreexpresión de una proteína de entre 75 y 100 kDa, consistente con el tamaño teórico de VP1 (83 kDa). Al comparar los datos teóricos con los obtenidos experimentalmente se confirma que el plásmido se insertó correctamente y que, adicionalmente al adicionar IPTG al medio de cultivo este induce la sobreexpresión de la proteína estructural VP1. Pudiendo continuar con el escalamiento y purificación de la proteína.

*Purificación de VP1 y VP2.*

Suponiendo que VP1 se comportaría como VP2 durante la sobreexpresión y purificación, por compartir la región estructural VP, la proteína tendría que encontrarse únicamente en cuerpos de inclusión. Para confirmar que VP1 forma cuerpos de inclusión, como lo hace VP2 y las quimeras con las que se han trabajado, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE para la fracción soluble y los cuerpos de inclusión después de la inducción con IPTG (Fig. 25).

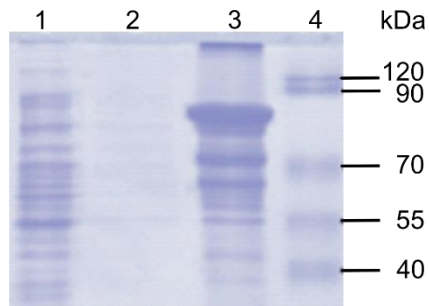


Fig. 25. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% para confirmar la formación de cuerpos de inclusión. Carril 1: Lisado celular de *E. coli* en fase exponencial. Carril 2: Fase soluble del lisado celular a 16 h de la inducción con IPTG. Carril 3: Cuerpos de inclusión del lisado celular a 16 h de adicionar IPTG. Carril 4: Marcador de peso molecular (Thermo Scientific Prestained Protein).

La figura 25 muestra las fracciones recuperadas del cultivo celular después de 16 horas de la inducción con IPTG. La fracción 1 es el lisado celular antes de la inducción; la fracción 2 corresponde a la fase soluble del lisado celular, en la que se nota la presencia de algunas proteínas, mas no la presencia de VP1. El carril 3 corresponde a los cuerpos de inclusión del lisado celular, en el que se observa claramente la presencia mayoritaria de VP1 (83 kDa). Al comprobarse la presencia de la proteína VP1 en los cuerpos de inclusión, el proceso de purificación se realizó en condiciones desnaturizantes, comenzando por los lavados de los cuerpos de inclusión.

Una vez que se contaba con los cuerpos de inclusión solubles se realizaron dos ciclos de purificación mediante IMAC con la metodología descrita en trabajos previos [43]. Para corroborar su eficiencia se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% a tres fracciones del ciclo de purificación (Fig. 26).

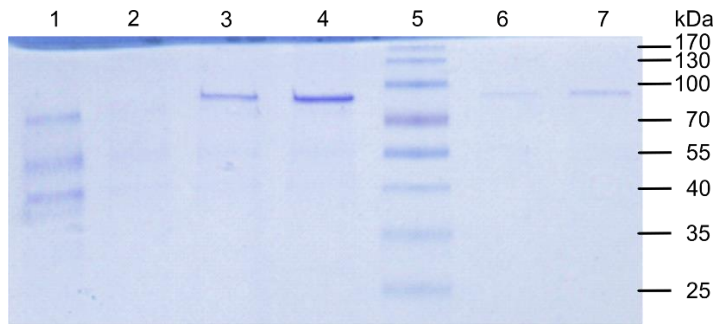


Fig. 26. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% con las fracciones de la purificación de VP1. Carriles 1 y 2, fracción 1; carriles 3 y 4, fracción 4; carril 5, marcador de peso molecular Bluestar Prestained Protein Marker; carriles 6 y 7, fracción 6 de dos ciclos de purificación independientes.

Como se puede observar en la Figura 26, la fracción 1 de ambos ciclos presenta contaminación; en el primer ciclo se aprecia una presencia mayor de contaminantes debido a que la proteína no se centrifugo antes de introducirla en la columna, proceso que, como se observa en el segundo ciclo, reduce las impurezas y concentra a la proteína. En las fracciones 4 y 6 de ambos ciclos, se distingue una banda de entre 75 y 100 kDa correspondiente a VP1, con una pureza aproximada al 80%. Por lo que se decidió utilizar este protocolo para la purificación total de VP1, teniendo en cuenta únicamente que, para concentrar la proteína se tomará a partir de la fracción 3 y hasta la 6.

Después de concentrar y cambiar de amortiguador el resto de la proteína, se realizó una nueva electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% para verificar la pureza de VP1 y descartar que se perdiera la proteína durante estos dos procedimientos (Fig. 27). Adicionalmente, para fines de este proyecto, se sobre expresó y purificó la proteína VP2, con los mismos protocolos diseñados y estandarizados para esta proteína [43]. La electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% de la purificación para ambas proteínas se muestra en la Figura 27.

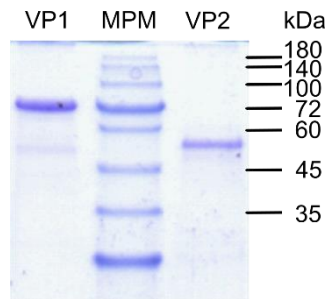


Fig. 27 Gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% para la purificación de las proteínas VP1 y VP2 una vez realizada la concentración y cambio de amortiguador para ambas proteínas. Marcador de peso molecular Prestained Protein Marker, All Blue.

El análisis por densitometría de la Figura 27 arroja que ambas proteínas se encuentran con una pureza aproximada del 82% y 86% para VP1 y VP2 respectivamente. La estimación de la concentración para ambas proteínas se realizó por interpolación con una curva patrón de BSA obtenida a 280 nm. La Tabla 5 muestra la concentración y rendimiento obtenidos para VP1 y VP2 respectivamente.



Tabla 5: Concentración y rendimiento de las proteínas VP1 y VP2 para un litro de medio de cultivo.

Proteína	Concentración final (mg/mL)	Volumen de Proteína obtenido	Rendimiento (mg proteína/L medio de cultivo)
VP1	2.08 ± 0.42	17 mL	35.41 mg/L
VP2	2.60 ± 0.10	13 mL	33.67 mg/L

### Caracterización de VLPs mediante DLS.

Los viriones del B19V y las VLPs obtenidas a partir de la proteína estructural VP2 poseen un tamaño que oscila entre los 18 y 24 nm [1, 2, 35]. Teniendo esto presente se espera que, sí la proteína VP1 es capaz de formar VLPs, estas presenten un tamaño mayor debido a la presencia de los 227 AA. adicionales que contiene en el extremo N-terminal. Un comportamiento similar se esperaría para aquellas VLPs híbridas que contengan VP1 en su estructura. La Figura 28 muestra las distribuciones por volumen de los cuatro ensambles estudiados, obtenidas de la dispersión dinámica de luz (DLS). En todos los casos se reporta el valor promedio de las medias de cada distribución y la desviación estándar de estos valores.

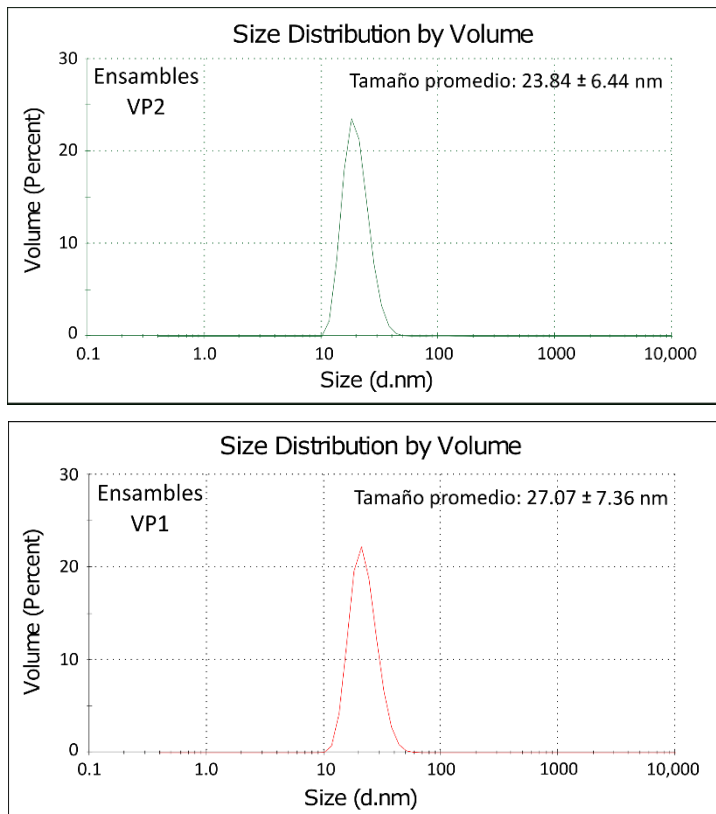
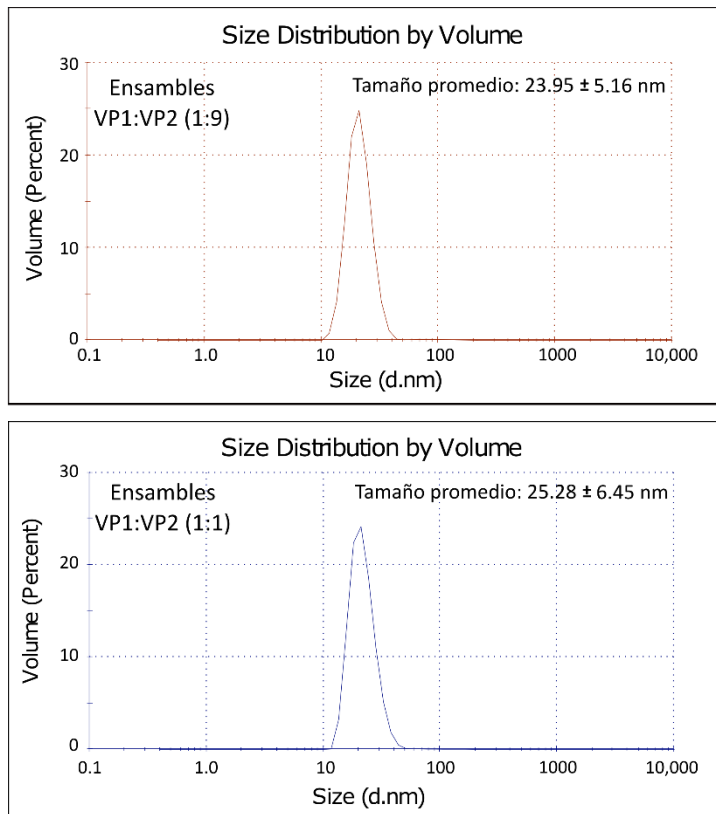


Fig. 28 Diagramas de dispersión por volumen para las pruebas de ensamble después de dializar 40 h a 4° C contra PBS-Arg. Panel A: VLPs de VP2 (Control). Panel B: Ensamblados de VP1. Panel C: Ensamblados utilizando VP1:VP2 (1:9 M). Panel D Ensamblados utilizando VP1:VP2 (1:1 M).



La distribución obtenida para las VLPs de VP2 muestra un tamaño promedio de partícula de  $23.8 \pm 6.4$  nm, dato que sirve como referencia tanto para corroborar que el ensamble ocurrió de manera efectiva, como del tamaño de las VLPs. El panel B muestra la distribución obtenida para el ensamble de VP1, obteniendo un tamaño de partícula promedio de  $27.1 \pm 7.4$  nm de diámetro, a pesar del valor en la desviación estándar, el comportamiento hidrodinámico de las VLPs de VP1 indica que estas partículas son más grandes que las VLPs de VP2. Este resultado aunado al hecho de no encontrar especies con diámetros de partícula menores a 15 nm (capsómeros), sugiere que la proteína VP1 es capaz de formar de manera *in vitro* VLPs por sí misma.

Además de presentar un diámetro hidrodinámico mayor, el ensamble de VP1 presenta una mayor desviación estándar, alcanzando poblaciones con diámetros de hasta 34 nm, lo que podría deberse a VLPs que contengan mayor número de regiones VP1u externalizadas o a un número mayor de monómeros incorporadas por cápside.

En los paneles C y D se observan los co-ensambles producidos por VP1 y VP2 en relación molar 1:9 y 1:1 respectivamente, con tamaños promedio de  $23.95 \pm 5.16$  y  $25.28 \pm 6.45$  nm de diámetro. Estos resultados indican la formación estable de VLPs



con ambas proteínas en su estructura, obteniendo así la primera evidencia indirecta de la presencia de VLPs construidas *in vitro* con VP1.

*Caracterización de VLPs mediante cromatografía de exclusión molecular.*

Otra manera indirecta de discriminar el correcto ensamble de VLPs fue su purificación mediante cromatografía de exclusión molecular. En esta técnica, suponiendo que las partículas con VP1 se comportaran similar a las VLPs de VP2 y sus quimeras, presentarían un tiempo de retención similar al reportado para estas (aprox. 74 min) [43]. Los cromatogramas obtenidos se muestran en la Figura 29.

La Figura 29 muestra en su panel A el cromatograma del ensamble de VP2, usado como control. En este caso el tiempo de retención del pico de máxima absorbancia es de 76 min, muy parecido al reportado para estas VLPs [43]. Se puede apreciar, además, un pico minoritario con un tiempo de retención de aproximadamente 100 min, el cual es debido a los intermediarios proteicos que no lograron incorporarse al ensamble, probablemente debido a una diálisis incompleta.

El panel B presenta el cromatograma obtenido por el ensamble conformado únicamente de la proteína VP1. La presencia de un pico cromatográfico con un tiempo de retención a máxima absorbancia de 72 minutos (menor al obtenido por VP2) sugiere la presencia de partículas con un diámetro ligeramente más grande que las VLPs de VP2. También se puede observar que no toda la proteína ensambló, ya que se advierte la presencia de intermediarios proteicos.

En los paneles C y D de la Figura 29 se presentan los cromatogramas obtenidos para los co-ensambles de VP1 y VP2 en relaciones molares 1:9 y 1:1 M respectivamente. En ambos casos se aprecia un pico con tiempos de retención a máxima absorbancia de 74 y 72 minutos respectivamente, lo que indica la presencia de partículas tipo virus estables y similares a las obtenidas únicamente por la proteína VP2. En ambos casos la presencia de intermediarios proteicos es evidente, así como la presencia de agregados proteicos para el caso del co-ensamble VP1:VP2 1:9 M.

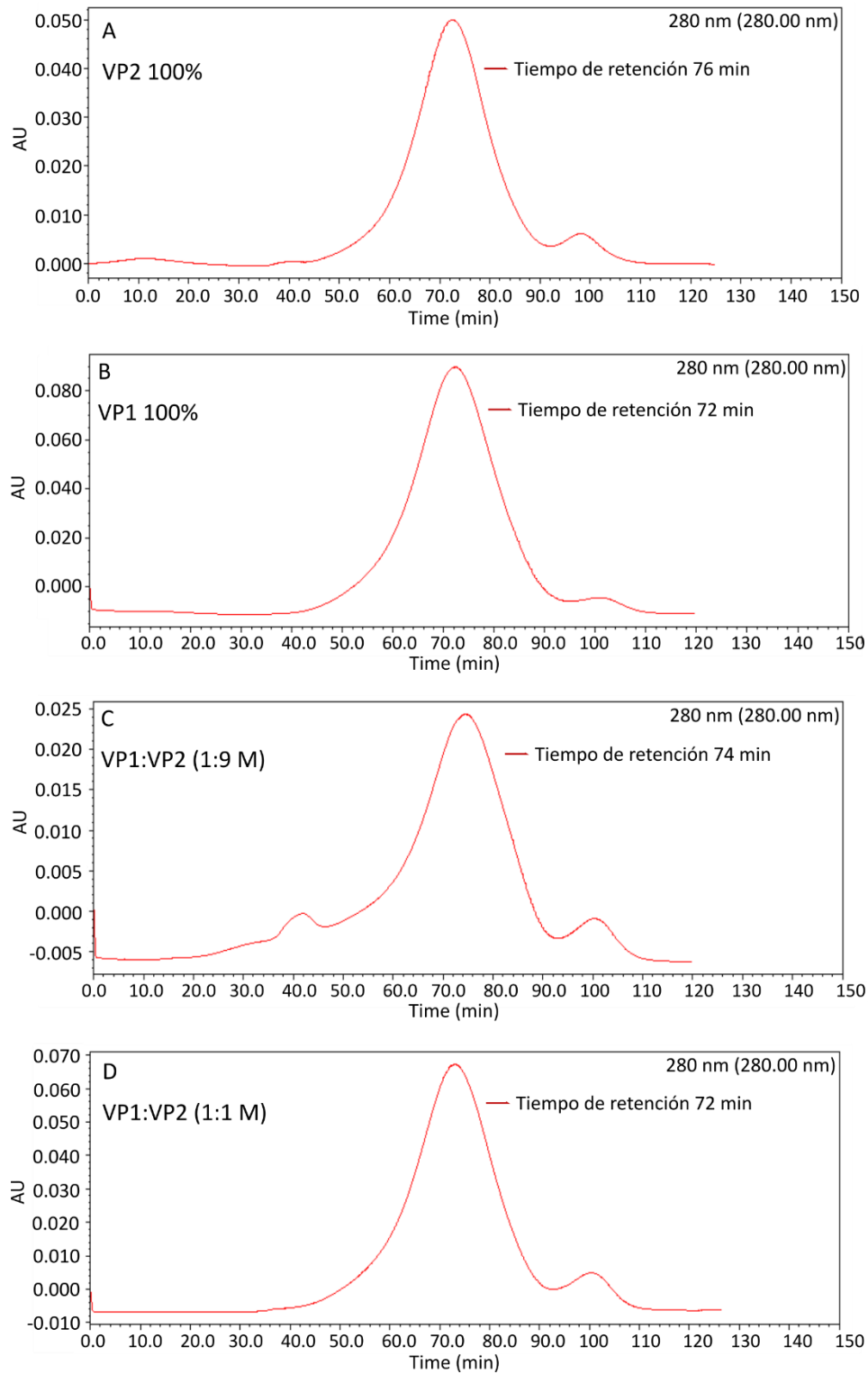


Fig. 29. Cromatogramas obtenidos mediante cromatografía de exclusión molecular utilizados como caracterización de las partículas obtenidas. A: Ensamble de VP2. B: Ensamble de VP1. C: Ensamble de VP1:VP2 (1:9 M). D: Ensamble de VP1:VP2 (1:1 M).

Las fracciones donde se recolectaron los picos de máxima absorbancia se analizaron mediante DLS para obtener el tamaño de estas partículas (Fig. 30). En la Tabla 6 se muestran los promedios de las medidas obtenidas.

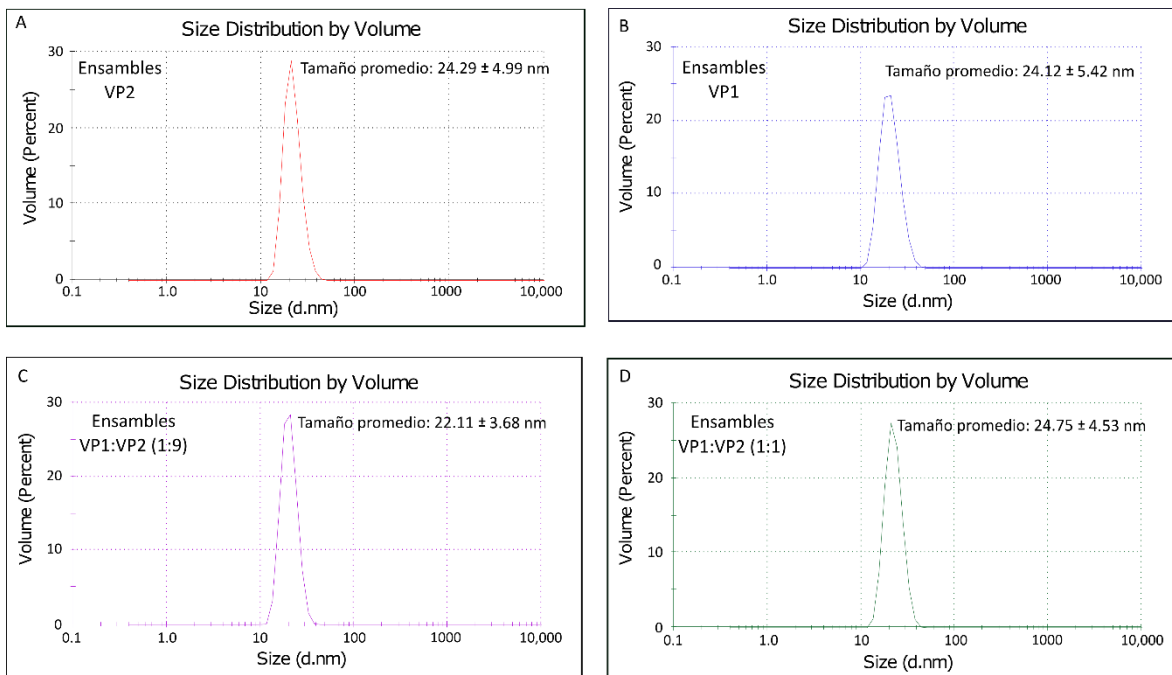


Fig. 30. Espectros de DLS para las fracciones de mayor absorbancia purificadas mediante cromatografía de exclusión molecular. A: VLPs de VP2. B: VLPs de VP1. C: Ensemble VP1:VP2 (1:9 M). D: Ensamble VP1:VP2 (1:1 M).

Tabla 6: Medidas obtenidas por DLS para los picos de máxima absorbancia en HPLC.

Ensamble	VP2	VP1	VP1:VP2 (1:9)	VP1:VP2 (1:1)
Tamaño promedio de partícula (nm)	24.3 ± 4.9 nm	24.1 ± 5.4 nm	22.1 ± 3.6 nm	24.75 ± 4.5 nm

El análisis del tamaño de partícula realizado por DLS a los ensambles purificados por cromatografía de exclusión molecular indica que, la proteína recuperada de los diferentes ensambles presenta un diámetro hidrodinámico característico para las VLPs de VP2. Estos resultados fueron la segunda evidencia indirecta de la obtención de partículas tipo virus que incluyen a la proteína VP1 en diferentes proporciones.

*Caracterización de VLPs mediante ultra-centrifugación isopícnica.*

La ultra-centrifugación isopícnica usando CsCl para generar un gradiente de densidad, permite corroborar la formación de partículas tipo virus logrando distinguir y separar las VLPs correctamente ensambladas de las especies intermediarias y de los agregados proteicos. Esta técnica se utilizó como una caracterización más de la formación de VLPs de VP1 y de VLPs co-ensambladas entre VP1 y VP2 (Fig. 31).

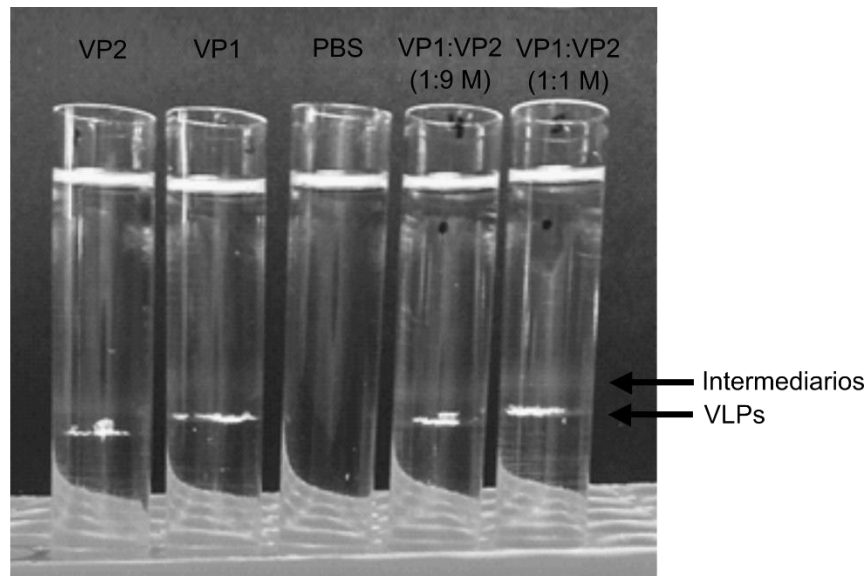


Fig. 31. Ultra-centrifugación isopícnica en gradiente de CsCl. De izquierda a derecha: Ensamblados a 40 h de VP2, VP1, blanco (PBS-Arg), VP1:VP2 1:9 y VP1:VP2 1:1 M.

En la Figura 31 se puede observar la presencia de dos bandas en todos los tubos con ensamble proteico: la primera con menor densidad, más amplia y casi imperceptible, correspondiente a los intermediarios proteicos; y la segunda banda más densa, delgada y opaca, perteneciente a las VLPs correctamente ensambladas, consistente con lo reportado por Sánchez-Rodríguez en 2012 [35].

Adicionalmente, esta técnica permite concentrar las muestras para evaluar la cantidad y tipo de proteína de los ensamblados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% SDS-PAGE, de esta manera se pudo corroborar que, en el caso de los co-ensamblados, las partículas obtenidas sí incorporan la proteína VP1 (Fig. 32).

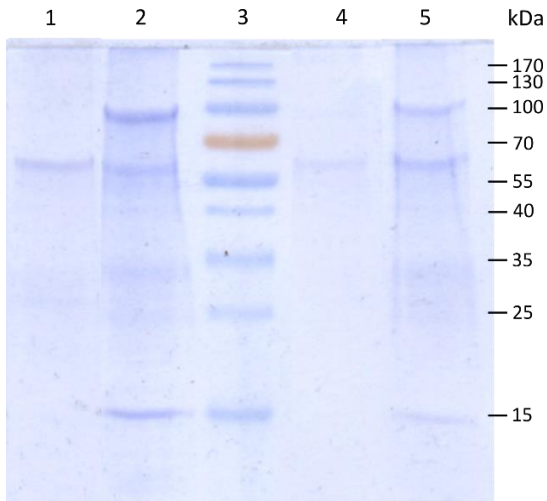


Fig. 32. Gel de poliacrilamida al 12% SDS-PAGE para los gradientes obtenidos por ultra-centrifugación isopícnica. Carril 1: Banda correspondiente a las VLPs de VP2. Carril 2: Banda correspondiente al ensamblaje de VP1. Carril 3: Marcador de peso molecular Bluestar Prestained Protein Marker. Carriles 4 y 5: Bandas correspondientes a las VLPs correctamente formadas para el ensamblaje VP1:VP2 (1:9 M) y VP1:VP2 (1:1 M) respectivamente.

Realizando un análisis por densitometría, al gel SDS-PAGE de la Figura 32, se obtuvo que para el caso del co-ensamblaje 1:9 M, la proporción de VP1 contenida es del 13.7%, incorporando de la proteína VP2 el 86.3% restante. Para el caso del co-ensamblaje VP1:VP2 (1:1 M) se encontró que la proteína VP1 se encuentra en un 40.4% mientras que VP2 en un 59.6%, lo que señala que efectivamente VP1 se está incorporando en proporciones similares a las planeadas teóricamente.

En cuanto al ensamblaje de VP1, la Figura 32 muestra la presencia de tres bandas mayoritarias: la primera perteneciente a la proteína estructural VP1 (83 kDa) con una presencia total aproximada al 41% del total de la proteína presente en él carril. Una segunda banda, con un tamaño cercano a los 56 kDa, similar al presentado por la proteína VP2, esta proteína se encuentra con una prevalencia cercana al 27% del total de las proteínas observadas en él carril. Por último, es evidente la presencia de una tercera banda con un tamaño aproximado a los 17 kDa, en este caso con una prevalencia aproximada al 12% del total de las proteínas observadas en el carril. Además de estas tres bandas mayoritarias es notoria la presencia de un barrido proteico entre las bandas de aproximadamente 58 kDa y la de 17 kDa, estos residuos proteicos de diferentes pesos moleculares representan aproximadamente el 20% del total de proteínas observadas en el carril.

Este resultado podría deberse a una purificación deficiente, que se evidencia al concentrar la muestra al somerla a la ultra-centrifugación isopícnica, o como se ha reportado para otros miembros de la familia Parvoviridae, debido a una auto proteólisis de la proteína de mayor peso molecular [67, 68, 69, 70].

Para intentar dilucidar si el comportamiento de la proteína VP1 es debido a su proteólisis, se realizó una curva patrón del cociente del corrimiento de las bandas contra el  $\log_{10}$  del tamaño de cada banda del marcador de peso molecular, esto permitió estimar más puntualmente el tamaño de las bandas contaminantes: 66 kDa

para la banda parecida a VP2 y 18 kDa para la banda pequeña. La sumatoria de estas dos bandas dan aproximadamente el tamaño de VP1, esto podría sugerir que las dos bandas provienen de la proteólisis de VP1, probablemente generando una versión análoga de VP2.

Para corroborar esta hipótesis se realizó el Western blot del ensamble de VP1 filtrado por 0.45 y 0.22  $\mu\text{m}$ . Utilizando la sonda HisProbe<sup>TM</sup>-HRP, la cual reconoce la etiqueta de His (HHHHHH) ubicada en el extremo C-terminal de la proteína. La Figura 33 muestra el resultado obtenido.

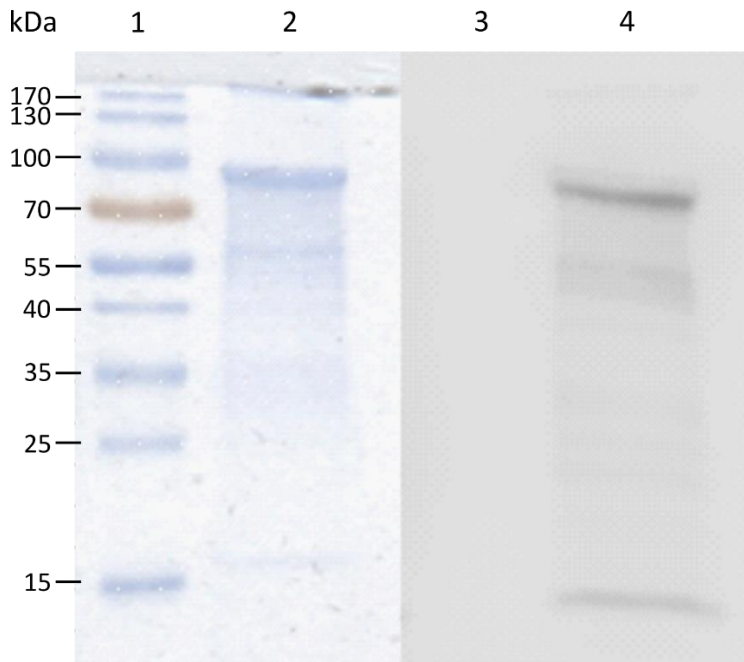


Fig. 33. Western blot del ensamble de VP1 utilizando HisProbe<sup>TM</sup>-HRP como anticuerpo. Panel A: Gel de poliacrilamida al 12% SDS-PAGE. Carril 1: Marcador de peso molecular Bluestar Prestained Protein Marker. Carril 2: Ensamble de VP1. Panel B: Western blot. Carril 3: Marcador de peso molecular Bluestar Prestained Protein Marker. Carril 4: Ensamble de VP1.

La Figura 33 muestra claramente la señal generada por la unión de la etiqueta de poli-His, presente en el C-terminal de VP1, con la sonda HisProbe<sup>TM</sup>-HRP. Sin embargo, es posible observar dos señales más generadas por la sonda, aunque de manera difusa, una con un peso molecular de 66 kDa y la correspondiente a la proteína con un peso molecular de 18 kDa. Este resultado puede estar implicando que ambas proteínas conservan el extremo C-terminal. Adicionalmente, es destacable que varias de las proteínas que se encuentran entre estas dos bandas también son tenuemente marcadas por unión con la sonda. Lo cual no arroja un resultado concluyente.

Estos resultados pueden deberse a diferentes factores, como se mencionó anteriormente es posible que la purificación de la proteína VP1 no sea óptima al

estar co-purificando proteínas de *E.coli* que presenten dominios ricos en histidinas; que la proteína VP1 se esté proteolizando de manera inespecífica; o por problemas de optimización en la técnica, como la concentración de la sonda HisProbe™ -HRP, el tipo de agente bloqueador utilizado o el tipo de membrana utilizada. Por lo que a partir de este único ensayo no es posible determinar si la proteína VP1 se está auto-proteolizando o no, y de ser así, de que extremo este ocurriendo el corte.

Es importante mencionar que, el corte proteolítico de las proteínas estructurales de algunos virus ha sido reportado. Como ejemplos de este fenómeno se encuentran el parvovirus bovino, el parvovirus Lull, el parvovirus canino (CPV) o el MVM, los cuales en las etapas maduras del virión generan a la proteína VP3 a partir de la proteína VP2 [67, 68]. La enzima o enzimas con las cuales se median estos cortes son aún desconocidas [69].

Adicionalmente en los adenovirus (ADV) se ha demostrado que cuando las cápsides se expresan en exceso, se produce una proteína desconocida de 26 kDa. Recientemente se identificó como un producto de la hidrólisis tanto de VP1 como VP2 en el AA D420 mediado por la actividad de caspasas [69].

Estos antecedentes dan la pauta para pensar que la proteína VP1 puede estarse proteolizando para generar proteínas análogas a VP2 en condiciones específicas de concentración, pH y temperatura. Sin embargo, se requiere del estudio con anticuerpos más específicos contra la región VP1u para corroborar la proteólisis de VP1 o la co-purificación de otras proteínas, y la optimización de la técnica para esta proteína y los anticuerpos a utilizar.

### *Caracterización de VLPs mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) y microscopía de transmisión electrónica (TEM).*

Hasta este punto la caracterización de las partículas obtenidas por el ensamble *in vitro* de VP1 y los co-ensambles que contienen VP1 y VP2 se ha realizado de manera indirecta, obteniendo evidencia favorable hacia la formación de VLPs estables. En estudios previos se ha reportado que, de manera *in vivo*, la relación máxima de VP1 contra VP2 para la correcta formación de VLPs estables era del 30% [55, 56]. La incorporación de VP1 en una mayor proporción llevó a la formación de partículas con bajos rendimientos y partículas mal formadas.

Por lo que, para corroborar que efectivamente la interacción de la proteína VP1 genera VLPs y no solo intermediarios, se preparó una muestra de ensamble de VP1 a 40 h de diálisis en las mismas condiciones antes descritas para ser observada mediante técnicas estructurales (AFM y TEM). Este ensamble se filtró por 0.45  $\mu\text{m}$  y 0.22  $\mu\text{m}$  y se analizó por DLS para confirmar el correcto ensamble (Fig. 34).



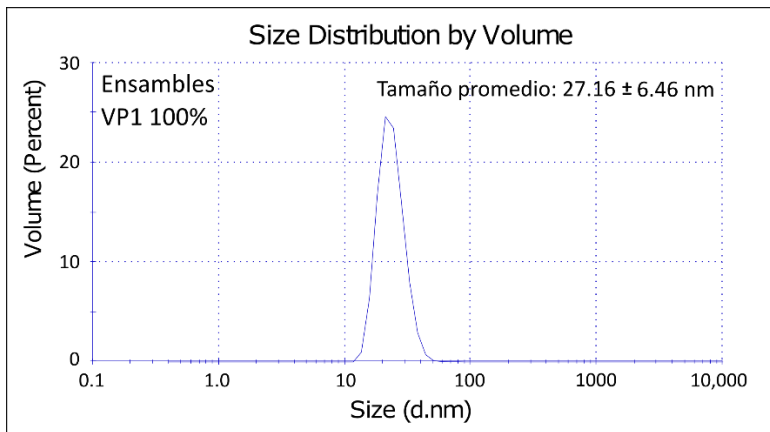


Fig. 34. DLS del ensamble de VP1 filtrado por 0.45 y 0.22  $\mu\text{m}$  corroborando el correcto ensamble utilizado para las microscopías de fuerza atómica y transmisión electrónica.

Una vez determinado el tamaño de partícula del ensamble de VP1, este fue analizado mediante AFM (Fig. 35) y TEM (Fig. 36).

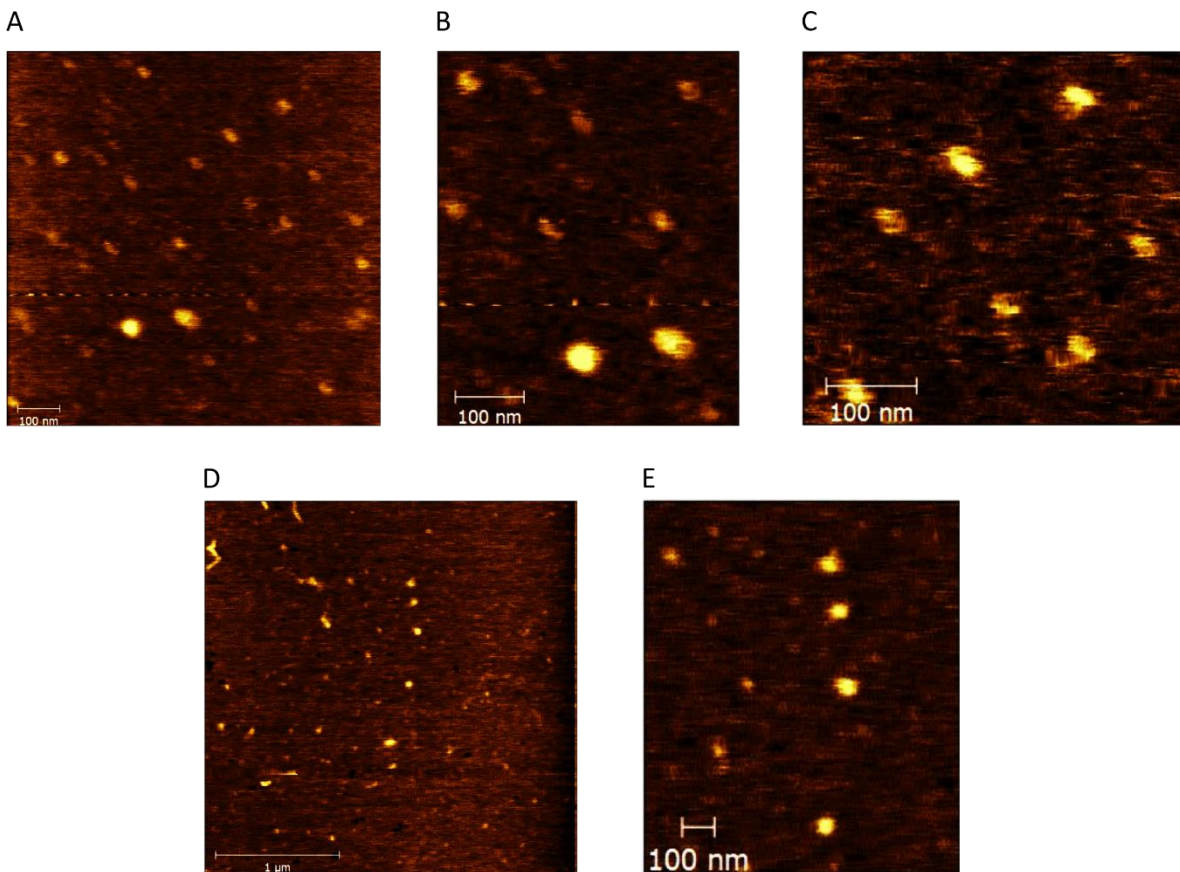


Fig. 35. Micrografías de las VLPs de VP1 obtenidas mediante AFM. La muestra fue obtenida diluyendo 1:1x10<sup>-9</sup> el ensamble filtrado por 0.45 y 0.22  $\mu\text{m}$ , y analizado previamente por DLS. Los paneles A y D muestran imágenes a diferentes acercamientos en diferentes regiones. Mientras que los paneles B y C muestran acercamientos a diferentes zonas de la imagen A. Y en el panel E se aprecia el acercamiento a la región central de la imagen D.



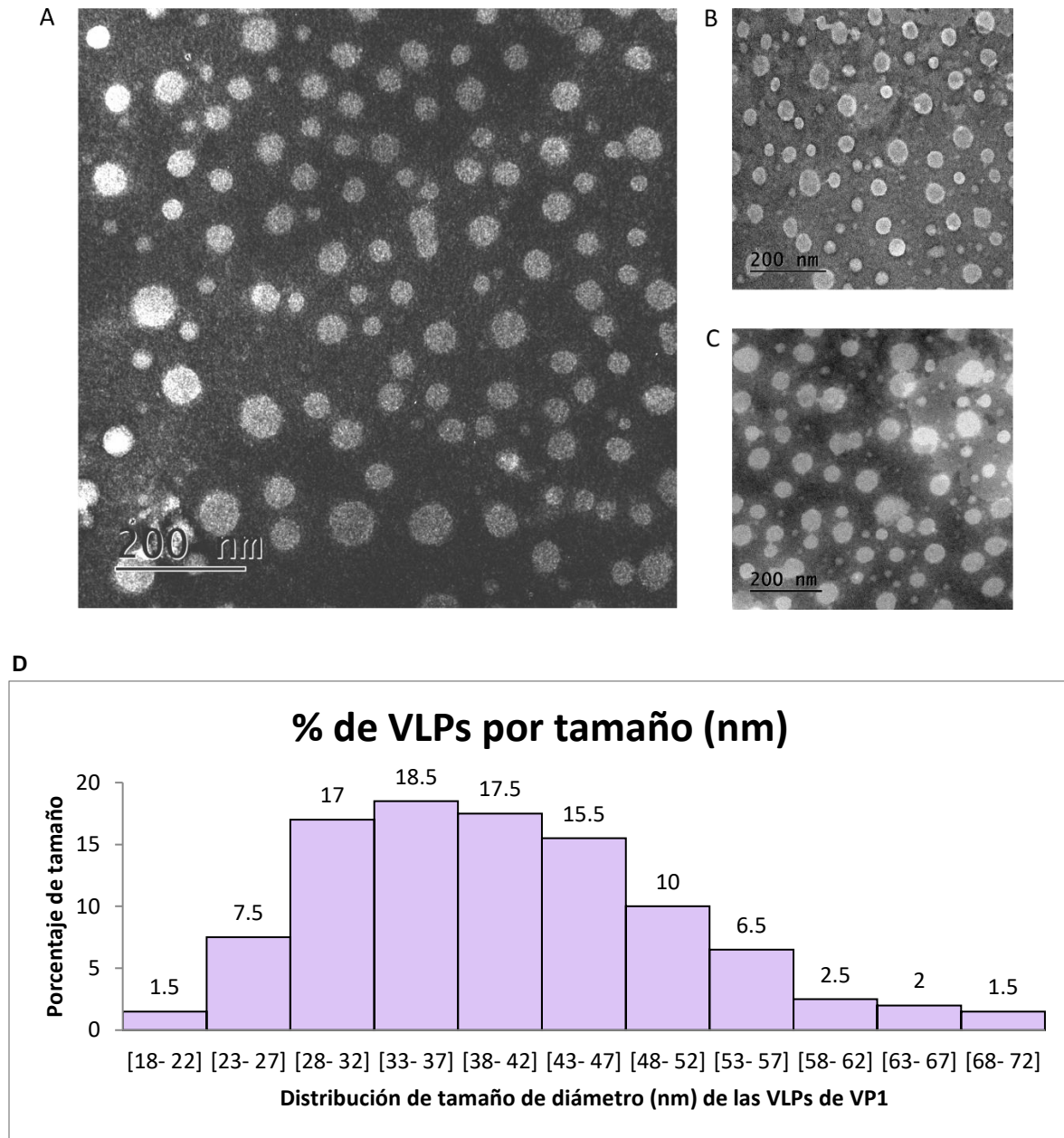


Fig. 36. Caracterización de VLPs de VP1 mediante TEM. Paneles A, B y C muestran las micrografías de diferentes campos del ensamble diluido 1:100 mediante TEM. D) Histograma de la frecuencia del tamaño de partícula.

Las imágenes obtenidas tanto por AFM como por TEM (Fig. 35 y 36) confirman la presencia de partículas tipo virus formadas a partir de la proteína estructural VP1 del B19V, resultado que de manera *in vivo* no era posible obtener.

Las micrografías obtenidas mediante TEM revelan la presencia de VLPs con tamaños diferentes. Para tener más información sobre este fenómeno, se midieron los diámetros de 200 VLPs para realizar un estudio poblacional (Fig. 36D). El

histograma muestra que alrededor del 70% de las partículas tienen un tamaño de entre 28 y 47 nm. Mientras que 5% de las partículas presentan tamaños correspondientes a las VLPs formadas por VP2 exclusivamente, y en el otro extremo del histograma se encuentran especies que alcanzan los 72 nm. Estos resultados confirmaron la presencia de partículas con una alta polidispersidad en el tamaño de partícula. A pesar de esto, todas las partículas se observan con una simetría parecida.

Este fenómeno no se ha observado en los viriones nativos ni en las VLPs del parvovirus B19, obtenidas tanto de manera *in vivo* como *in vitro*. Este comportamiento probablemente puede deberse a la cantidad de regiones VP1u externalizadas en cada tipo de partícula. Sin embargo, otra hipótesis plausible es la de tener partículas conformadas por un número mayor de monómeros de proteína, debido a la presencia de nuevas interacciones generadas por la VP1u y sus fragmentos.

La formación de nuevas interacciones entre monómeros para lograr generar cápsides con diferente número de triangulación es un fenómeno observado en diferentes virus, como los parvovirus SV40, CCMV y BMV [70, 71, 72]. Observando que cambios en la concentración proteica, condiciones de pH o fuerza iónica, e incluso truncamientos en sus proteínas estructurales promueven la formación de partículas no idénticas a las que de manera natural o *in vivo* se logran obtener.

Sin embargo, con los datos obtenidos hasta el momento no es posible dar una respuesta certera a la presencia del polimorfismo observado, para poder dilucidar esta situación es necesario realizar estudios estructurales como, por ejemplo, la CryoEM, que en el caso de Tang. J y colaboradores ayudó a discernir tres poblaciones con números de triangulación diferentes formadas a partir de las distintas interacciones formadas por los monómeros de una sola proteína [70].

### *Determinación de la actividad catalítica de PLA<sub>2</sub> perteneciente a VP1u mediante cromatografía en placa fina (TLC).*

Una manera indirecta de discernir si la región N-terminal de VP1 en las VLPs que la contienen esta externalizada y correctamente replegada, fue la evaluación de la actividad catalítica de PLA<sub>2</sub> que presenta intrínsecamente VP1u. Para este fin se retaron las VLPs de VP2 (usada como control negativo), las VLPs de VP1 y los ensamblajes VP2:VP1 (en proporciones 9:1 y 1:1 M) contra fosfatidilcolina (FC), la cual es uno de los sustratos de elección para este tipo de fosfolipasas.

La reacción enzimática se siguió después de una hora a 37 °C mediante cromatografía en capa fina (Fig. 37). La hidrólisis del fosfolípido por parte de la PLA<sub>2</sub>

dio como resultado la obtención de un ácido graso libre (AG), un liso fosfolípido (lisofosfatidilcolina: LFC) y el remanente de FC como se encuentra reportado [13].

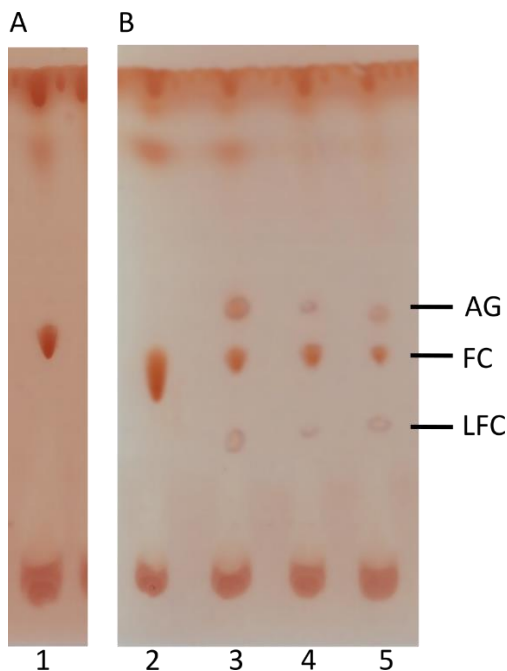


Fig. 37. TLC de actividad de PLA<sub>2</sub> sobre FC a 37 °C/1 h. Revelado con yodo. Panel A: Blanco de reacción (FC, PBS-Arg, amortiguador A<sub>ACT</sub>). Panel B. Carril 2: Reacción enzimática VLPs de VP2. Carril 3: Reacción enzimática VLPs de VP1. Carril 4: Reacción enzimática VLPs de VP1:VP2 (1:9 M). Carril 5: Reacción enzimática de VLPs de VP1:VP2 (1:1 M).

En el panel A de la Figura 37 se presenta el blanco de reacción (FC, PBS-Arg, amortiguador A<sub>ACT</sub>), en el cual se observa que el sustrato se encuentra prácticamente puro. El panel B muestra la placa para las 4 reacciones enzimáticas de los ensamblajes que hasta el momento se trabajaron: VLPs de VP2, VLPs de VP1, VLPs para los co-ensamblajes VP1:VP2 (1:9 M) y VP1:VP2 (1:1 M). Como era de esperarse, en el carril 2 donde se encuentra la reacción de la FC con las VLPs de VP2, el patrón de la FC no presenta modificaciones. A partir del carril 3 y hasta el 5 en donde se encuentran las VLPs que contienen VP1 en diferentes proporciones, se observa el cambio en el patrón de la FC, dando lugar al característico de la hidrólisis de la fosfatidilcolina [13].

Este resultado demuestra de manera indirecta y cualitativa que, hay regiones N-terminal externalizadas y con un correcto plegamiento en los ensamblajes obtenidos. Probablemente esto ocurre con mayor frecuencia en las VLPs de VP1 ya que se observa con mayor claridad la presencia de los subproductos de la hidrólisis del sustrato.

En este punto, es importante recordar que en la literatura se sugiere que el dominio con actividad PLA<sub>2</sub> solo presenta catálisis dentro del lisosoma, una vez que se da el cambio conformacional de la VP1u al interactuar con los receptores celulares.

Tomando en cuenta lo anterior, nuestros resultados implican que la proteína VP1, replegada mediante diálisis, está tomando su conformación activa.

#### *Actividad hemolítica de PLA<sub>2</sub> de VP1 en RBC.*

Al comprobar que una proporción de la región única de VP1 está correctamente plegada y con extremos N-terminales expuestos en la superficie de la cápside, nos preguntamos si la actividad de PLA<sub>2</sub> que presentan las VLPs que contienen VP1 es dañina para las células blanco. Por este motivo se realizó un ensayo de la capacidad hemolítica de las VLPs obtenidas contra eritrocitos de tres personas diferentes.

Se determino la concentración de Hb a 540 nm contra una curva patrón generada por hemólisis de los eritrocitos a diferentes concentraciones osmóticas. A la par se realizó una TLC contra FC para corroborar que el nuevo lote de VLPs presentaba actividad catalítica (Fig. 38).

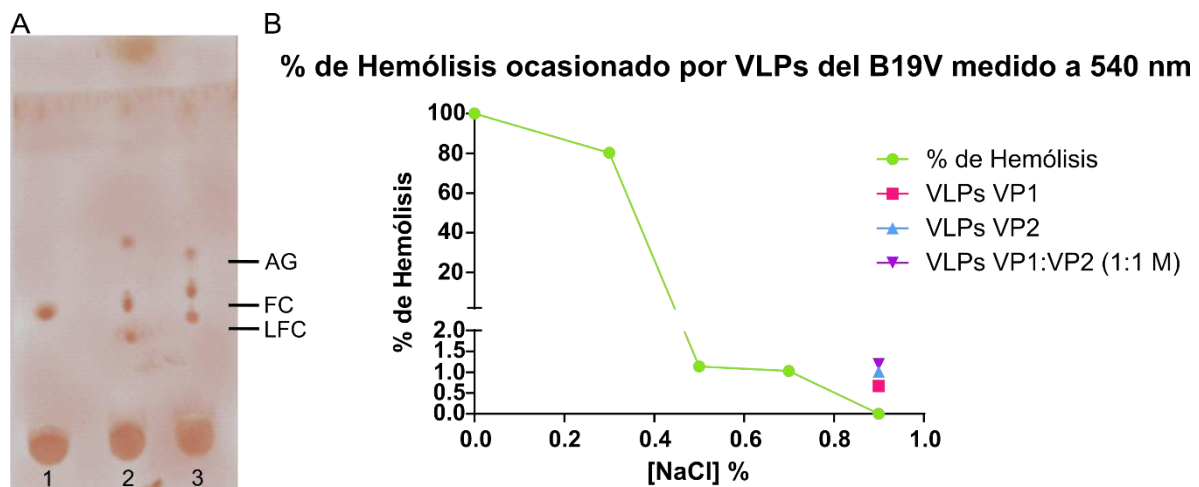


Fig. 38. Prueba de actividad catalítica de PLA<sub>2</sub> de las VLPs con VP1. Panel A: TLC de la reacción enzimática a 37 °C durante 1 h contra FC, revelada con Yodo. Reacción de VLPs de VP2 (carril 1), VLPs de VP1 (carril 2) y VLPs VP1:VP2 1:1 M (carril 3). Panel B: Curva de hemólisis de RBC a diferentes concentraciones de NaCl y hemólisis provocada por las VLPs: VP2, VP1 y VP1:VP2 1:1 M.

La Figura 38A muestra el patrón de hidrólisis de la FC generado por la PLA<sub>2</sub> presente en las VLPs que contienen, lo que confirma que el lote de VLPs presenta actividad catalítica. Con estas VLPs se realizó el ensayo de hemólisis en eritrocitos. La Figura 38B, no muestra diferencias significativas entre el grado de hemólisis que provocan las VLPs de VP2 (control negativo) contra las VLPs que contienen VP1 en su composición, por lo que la hemólisis es nula o despreciable.

Estos datos demuestran que, a pesar de encontrar el dominio con actividad de PLA<sub>2</sub> de VP1 correctamente plegado, exteriorizado y demostrando su capacidad de

hidrólisis contra FC, estas VLPs no causan la ruptura de la membrana celular. Por lo que, se puede pasar a la etapa del estudio de la internalización de VLPs que contengan VP1 en líneas celulares. Esto brindaría información relevante para considerar a las VLPs del B19, que contienen ambas proteínas estructurales: VP1 y VP2, como potenciales nano-acarreadores de entrega intracelular.

Para este ensayo es necesario contar con cápsides que sean fácilmente detectadas dentro de las células, por lo que se prosiguió con la funcionalización de las VLPs que contienen VP1 con la proteína verde fluorescente superfolder (sfGFP), lo que permitirá el monitoreo mediante microscopía confocal.

Debido a que se propone que las cápsides interactúan en un primer paso con los motivos del eje de simetría de orden 3, la funcionalización con sfGFP en el asa más móvil y próxima al eje de simetría de orden 3 no es lo óptimo, ya que podría obstaculizar la interacción con el Gb4Cer. Por este motivo se decidió que la funcionalización con la proteína sfGFP se realizaría en el extremo N-terminal que, como se ha observado, si logra externalizarse.

Para este fin se utilizó el sistema SpyTag-SpyCatcher, donde el péptido SpyTag se encuentra unido a la proteína estructural VP2 en su extremo N-terminal (ST-VP2); y el péptido SpyCatcher unido a la sfGFP por su extremo C-terminal, denominándose sfGFP-SC.

#### Co-ensamble de VLPs con ST-VP2:VP2:VP1.

Las proteínas adicionales que se usaron en esta etapa del proyecto fueron expresadas en *E. coli* BL21(DE3) a partir del plásmido pET22b (+). La Figura 39 muestra los mapas de los vectores.

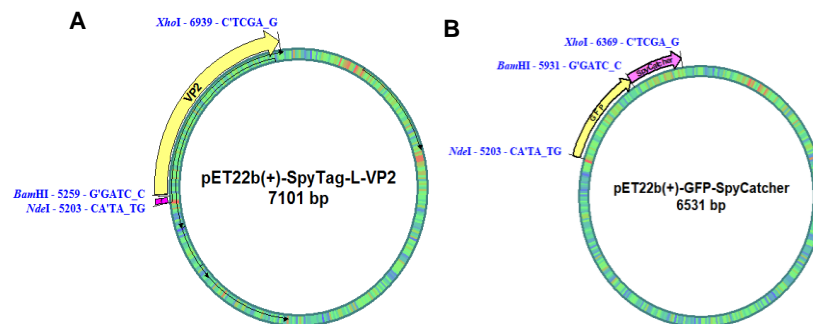


Fig. 39. Plásmidos que codifican para las proteínas: ST-VP2 (A) y sfGFP-SC (B).

La Figura 40 muestra la electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% SDS-PAGE de la purificación de todas las proteínas a ocupar en esta etapa del proyecto.

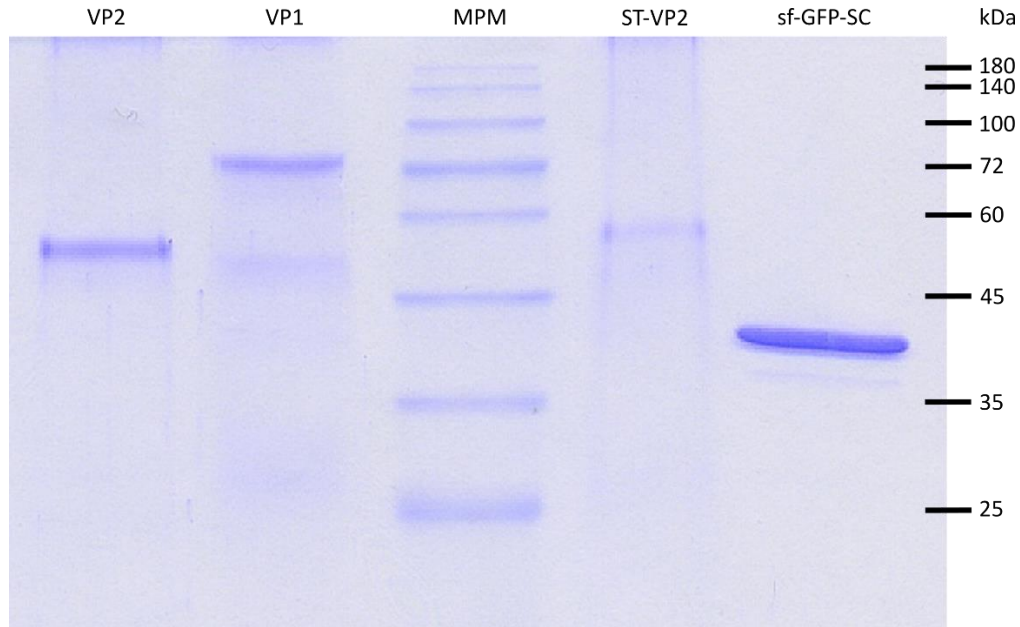


Fig. 40. Gel de poliacrilamida al 12% SDS-PAGE de las proteínas de interés purificadas para la funcionalización de las VLPs de VP1 con sfGFP. Carril 1: VP2. Carril 2: VP1. Carril 3: Marcador de peso molecular BlueClassic Prestained Protein Marker. Carril 4: ST-VP2. Carril 5: sfGFP-SC.

El análisis mediante densitometría del gel SDS-PAGE mostrado en la Figura 40 indica que las proteínas presentan un alto nivel de pureza: VP2 con un 78%, VP1 presentando un 64%, ST-VP2 con una pureza del 81% y la proteína sfGFP-SC con una pureza del 89%, y encontrándose todas en el peso molecular esperado: VP2: 58 kDa, VP1: 83 kDa, ST-VP2: 60 kDa y sfGFP-SC: 43 kDa.

Para el desarrollo de las VLPs susceptibles a funcionalizarse con la proteína sfGFP-SC, se tomó en cuenta el impedimento estérico resultante del co-ensamble de ST-VP2 y VP1 en el extremo N-terminal, lo que podría resultar en un ensamble o funcionalización deficiente. Dado que la funcionalización de las VLPs es resultante de la interacción covalente de los péptidos Spy-Tag y Spy-Catcher, es necesario que la proporción de ST-VP2 en las cápsides sea considerable. En cuanto a VP1, es importante recordar que, en los viriones nativos su presencia es minoritaria. Por este motivo se optó por la formación de VLPs co-ensambladas con VP2, ST-VP2 y VP1 en proporciones 55:30:15. En la Tabla 7 se muestran las concentraciones de



las proteínas, para el cálculo del co-ensamble, manteniendo 1.5 mL por ensamble a una concentración de 0.5 mg/mL, llevando al volumen con amortiguador GPU.

Tabla 7. Concentración proteica y porcentaje de las proteínas utilizadas para el co-ensamble.

Proteína	Peso Molecular	[Proteína] mg/mL	% Ensamble	Vol. de proteína
VP1	83 kDa	5.58 mg/mL	15 %	57 µL
ST-VP2	60 kDa	1.56 mg/mL	30 %	154 µL
VP2	58 kDa	1.43 mg/mL	55 %	263 µL

En el caso de este co-ensamble, por la experiencia en el grupo de trabajo con ensambles más complejos [43], se decidió realizar la diálisis contra PBS2X-Arg 0.2 M para garantizar el ensamble completo. Fuera de este cambio en el protocolo de ensamble, no se modificaron otras condiciones.

La caracterización del co-ensamble se empezó por la purificación de VLPs mediante filtración en gel, a la par se realizó un ensamble de VP2 como control.

Como se puede observar en la Figura 41, ambos ensambles presentan un patrón similar, con tiempos de retención de 73 min y 72 min para los ensambles de VP2 y el co-ensamble VP1:ST-VP2:VP2 respectivamente. Esta disminución en el tiempo de retención del ensamble de VP2 en comparación con los cromatogramas obtenidos anteriormente puede deberse al cambio de amortiguador con el que se llevó a cabo el ensamble, o a un evento de empaquetamiento de la columna utilizada. Por lo que para el co-ensamble tampoco se considera que las partículas obtenidas tengan un diámetro mayor (Fig.41).

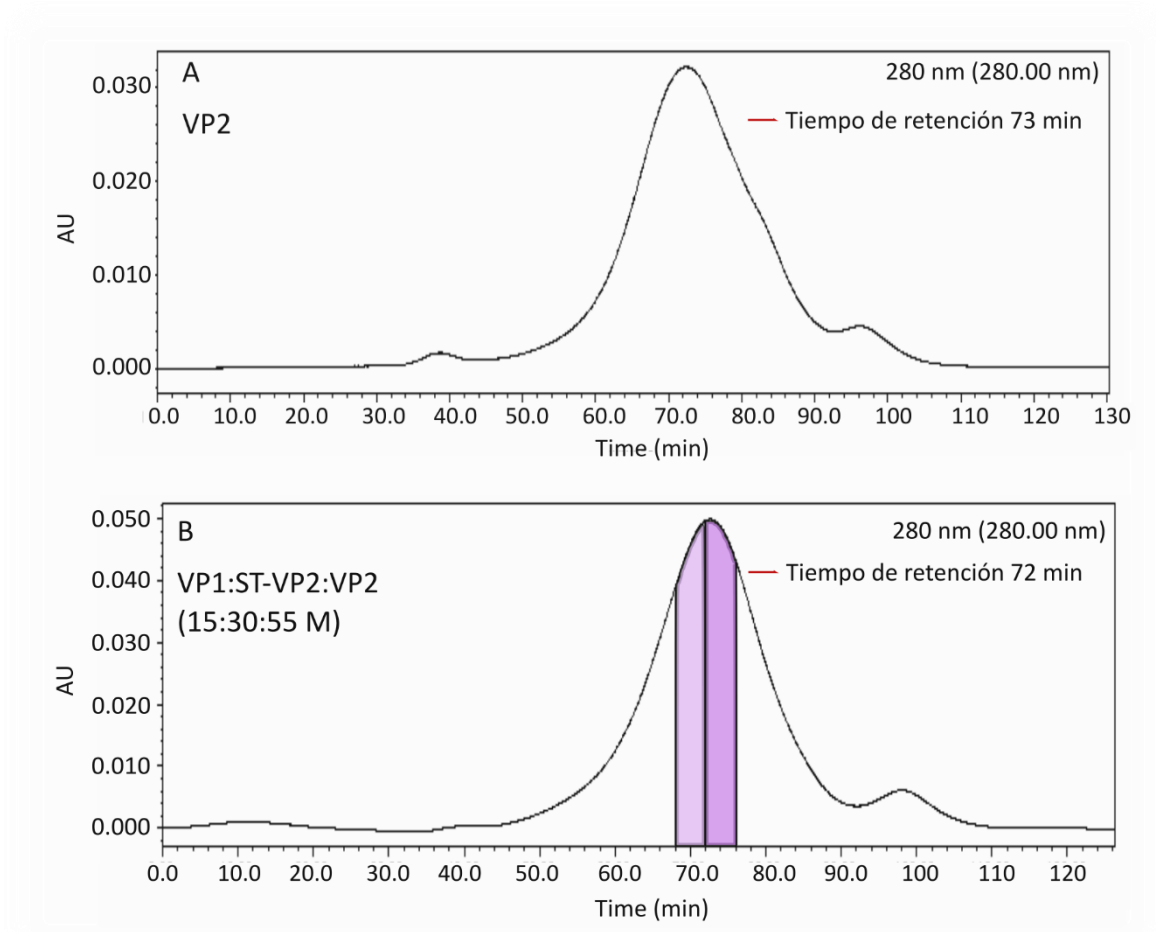


Fig. 41. Cromatogramas obtenidos mediante filtración en gel. Panel A: Purificación de VLPs de VP2 utilizado como control. Panel B: Purificación del co-ensamble VP1:ST-VP2:VP2 15:30:55 M: Fracción 5 en lila, y fracción 6 sombreada en morado.

Las fracciones con la mayor absorbancia fueron analizadas mediante DLS para corroborar el tamaño de partícula (Fig. 42). En el caso del co-ensamble el pico de máxima absorbancia se da en el cambio de fracción por lo que se analizaron ambas fracciones, es probable que las VLPs con mayor cantidad de VP1 se encuentren en la primera fracción.



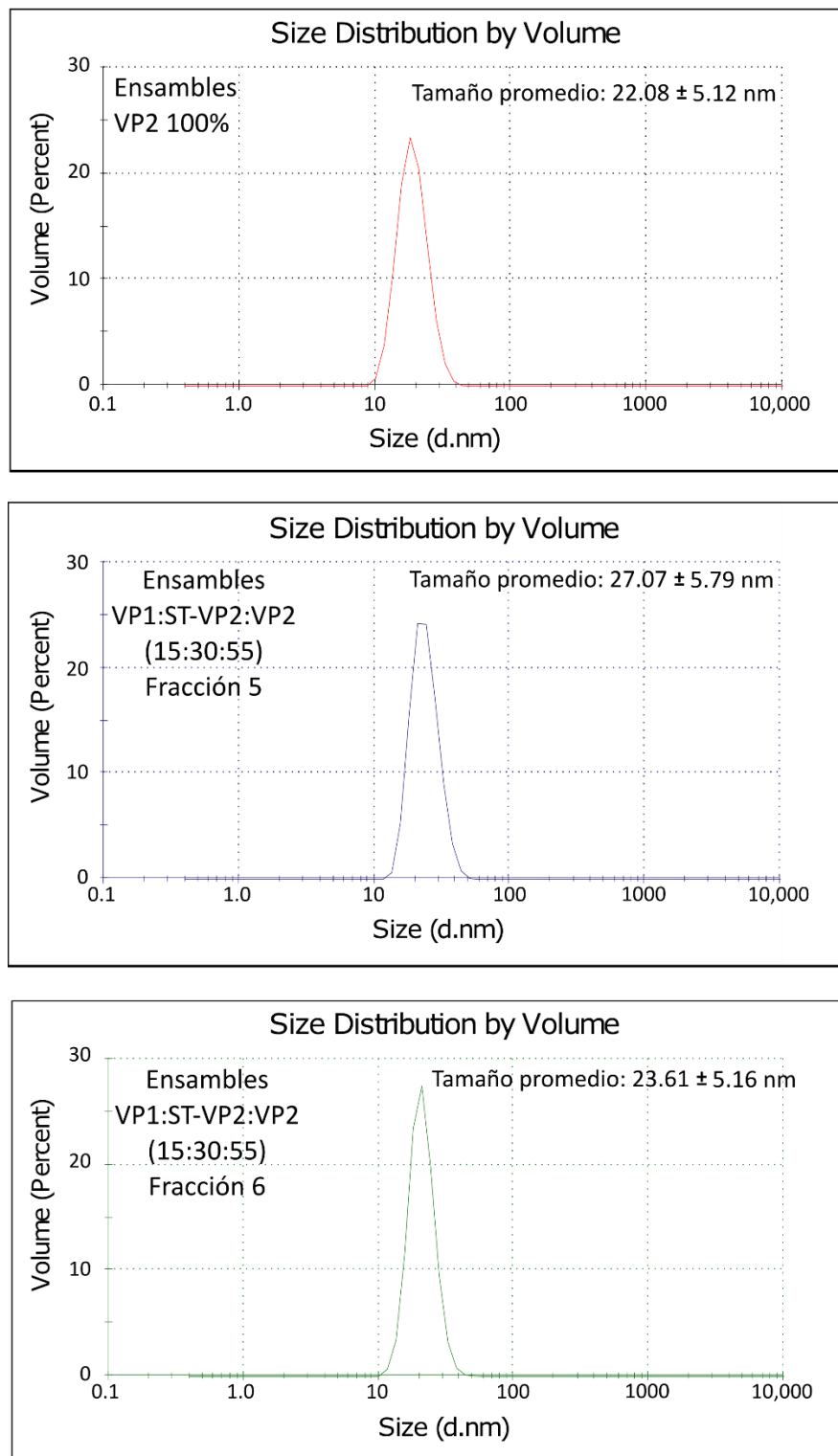


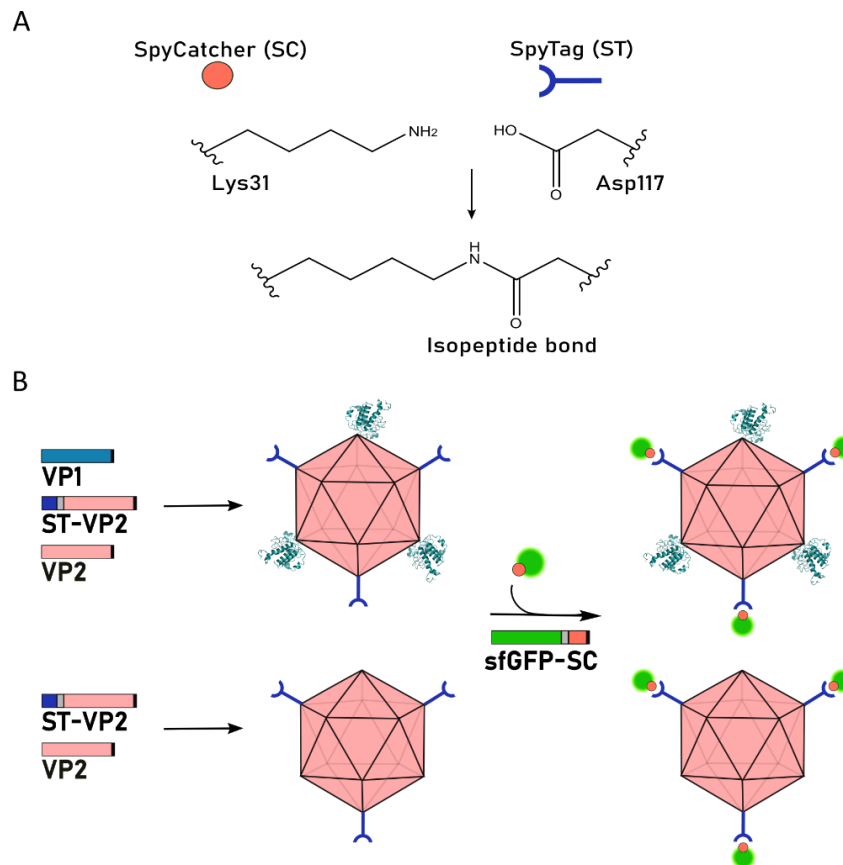
Fig. 42. DLS obtenidos después de la purificación por exclusión molecular. Panel A: Fracción de máxima absorbancia para el ensamble de VP2. Panel B: Primera fracción obtenida por exclusión molecular para el co-ensamble VP1:ST-VP2:VP2 15:30:55 M. Panel C: Segunda fracción para el co-ensamble VP1:ST-VP2:VP2 15:30:55 M.

La Figura 42 muestra todas las fracciones analizadas, las cuales presentan tamaños de partícula característicos de VLPs, confirmando que el co-ensamble de las tres proteínas se realizó correctamente.

En cuanto al co-ensamble, la fracción con menor tiempo de retención (fracción 5) presenta un diámetro promedio de  $27.07 \pm 5.79$  nm en comparación con la siguiente fracción, la cual presenta un diámetro de  $23.61 \pm 5.16$  nm, se decidió trabajar con la fracción 6, debido únicamente a que presenta el tamaño característico de las cápsides del parvovirus B19.

### *Funcionalización de las VLPs mediante el sistema SpyTag/SpyCatcher.*

Al comprobar que, se obtienen VLPs con las tres proteínas de interés (VP2, ST-VP2 y VP1), se prepararon bajo las mismas condiciones antes descritas los ensambles a utilizar en los ensayos con hepatocitos. Como control negativo para la internalización VP2:ST-VP2 (70:30) y el ensamble antes descrito VP2: ST-VP2: VP1 (55:30:15). Estas partículas fueron posteriormente incubadas con sfGFP-SC durante 3 h a 27 °C para lograr su funcionalización. La Figura 43 muestra el esquema de trabajo del sistema de acoplamiento SpyTag-SpyCatcher.



En el gel de poliacrilamida al 9% SDS-PAGE de la Figura 44 se observa la formación del enlace isopeptídico formado por los péptidos SpyTag y SpyCatcher, apreciando una banda adicional en los carriles 3 y 7 con un peso molecular aproximado de 100 kDa, valor teórico esperado para la interacción de las proteínas ST-VP2 (60 kDa) y la sfGFP-SC (43 kDa).

Es de resaltar que esa banda no se encuentra en los controles que se usaron, en donde se colocaron las proteínas ST-VP2, interacción VLPs VP2 con sfGFP-SC, VP2 y co-ensamble VP2:ST-VP2:VP1 respectivamente (carriles 1, 2, 5 y 6).

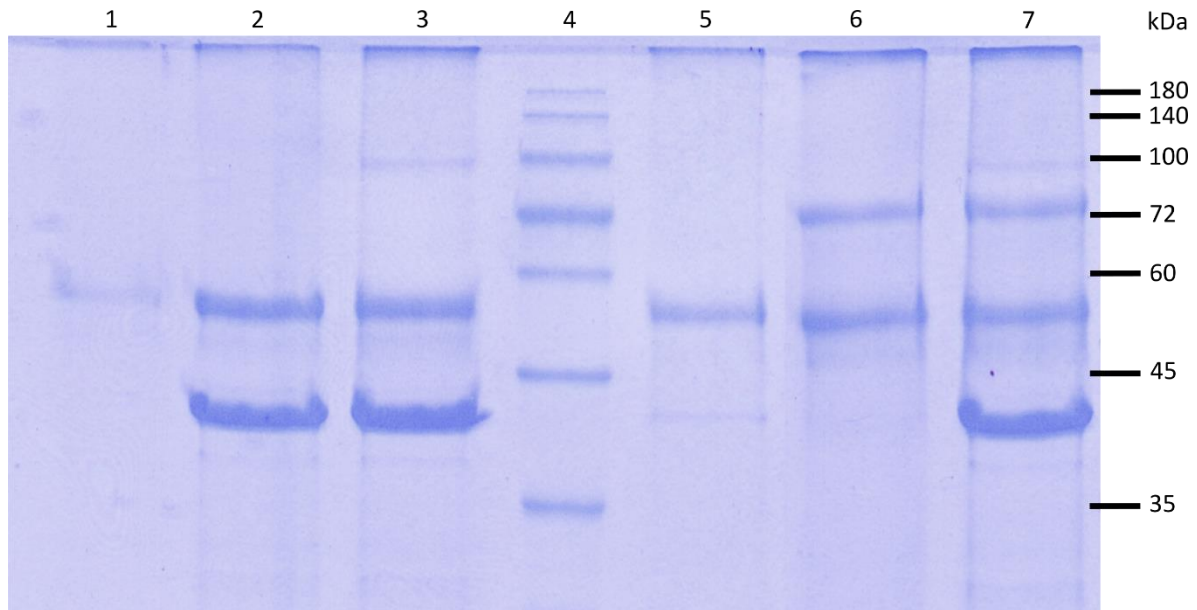


Fig. 44. Gel de poliacrilamida al 9% SDS-PAGE de las interacciones entre las VLPs con ST-VP2 y la sfGFP-SC. Carril 1: ST-VP2. Carril 2: VLPs VP2 con sfGFP-SC. Carril 3: Interacción co-ensamble VP2: ST-VP2 (70:30) con sfGFP-SC. Carril 4: Marcador de peso molecular BlueClassic Prestained Protein Marker. Carril 5: VP2. Carril 6: Co-ensamble VP2: ST-VP2: VP1 (55:30:15). Carril 7: Interacción entre el co-ensamble VP2: ST-VP2: VP1 (55:30:15) y sfGFP-SC.

Aun cuando la interacción entre las proteínas que contienen los péptidos SpyTag-SpyCatcher parece ser poca, se comprueba que se lleva a cabo en estos co-ensambles. Este nivel de interacción es suficiente para los análisis con microscopía confocal en células HepG2.

#### *Caracterización de VLPs funcionalizadas con sfGFP-SC por microscopía de fuerza atómica (AFM).*

Como último paso de la caracterización de las VLPs obtenidas por el co-ensamble ST-VP2:VP2:VP1 (30:55:15) funcionalizadas con sfGFP-SC, se prepararon las VLPs obtenidas para su visualización mediante AFM. Debido a la concentración de

la muestra las imágenes recopiladas se obtuvieron de campos con una baja densidad de proteína, sin lograr un óptimo acercamiento, al verse interrumpida la señal de la punta por la saturación de proteína en campos cercanos (Fig. 45).

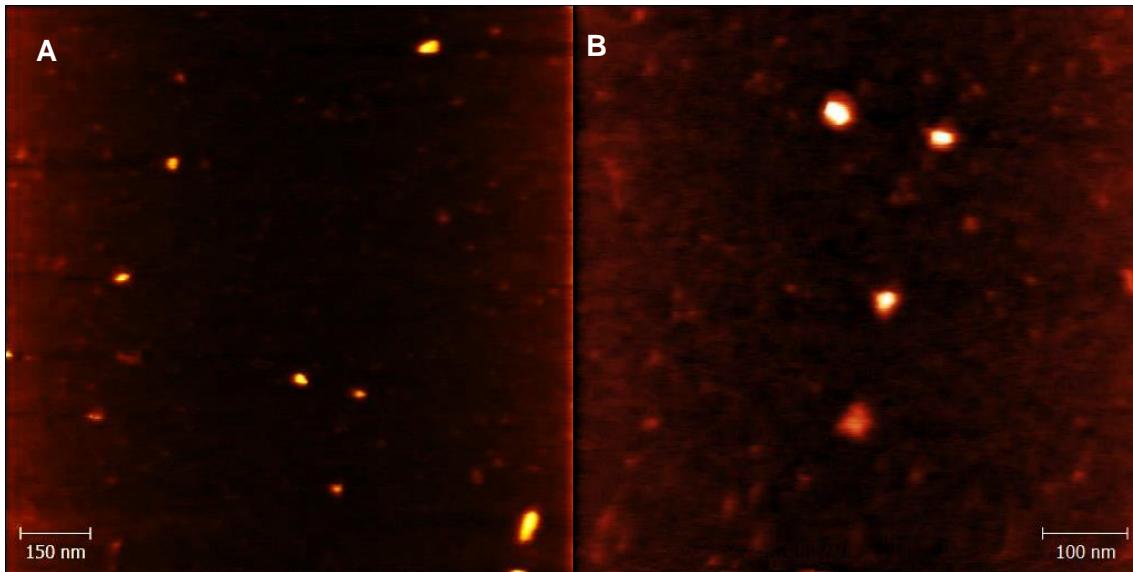


Fig. 45. Imágenes de las VLPs obtenidas mediante AFM. Panel A: Micrografía a una región con baja densidad de proteína de las VLPs del co-ensamble ST-VP2:VP2:VP1 (30:55:15) funcionalizadas con sfGFP-SC. Panel B: Acercamiento a la región inferior del panel A.

La Figura 45A muestra una micrografía a una de las zonas con menor densidad de proteína, en este campo es clara la presencia de alrededor de 7 VLPs con tamaños entre los 26 y 33 nm. En el panel B de la misma figura se observa un acercamiento a la región inferior de la imagen anterior, con este acercamiento se logra corroborar los tamaños de partícula obtenidos en el panel anterior. Confirmando así que se logran obtener VLPs del co-ensamble de las tres proteínas de interés, y que se logró funcionalizar a las VLPs con sfGFP-SC. Con estos resultados comenzamos con las pruebas de internalización en la línea celular HepG2.

#### *Ensayos de unión e internalización de VLPs con ST-VP2:VP2:VP1 funcionalizadas con sfGFP-SC en células HepG2.*

Teniendo listas las proteínas a utilizar y verificando que tanto el co-ensamble como su funcionalización fueron procesos exitosos, se procedió a realizar los ensayos en células de carcinoma hepático HepG2. El esquema de trabajo para este ensayo se presenta en la Figura 46.

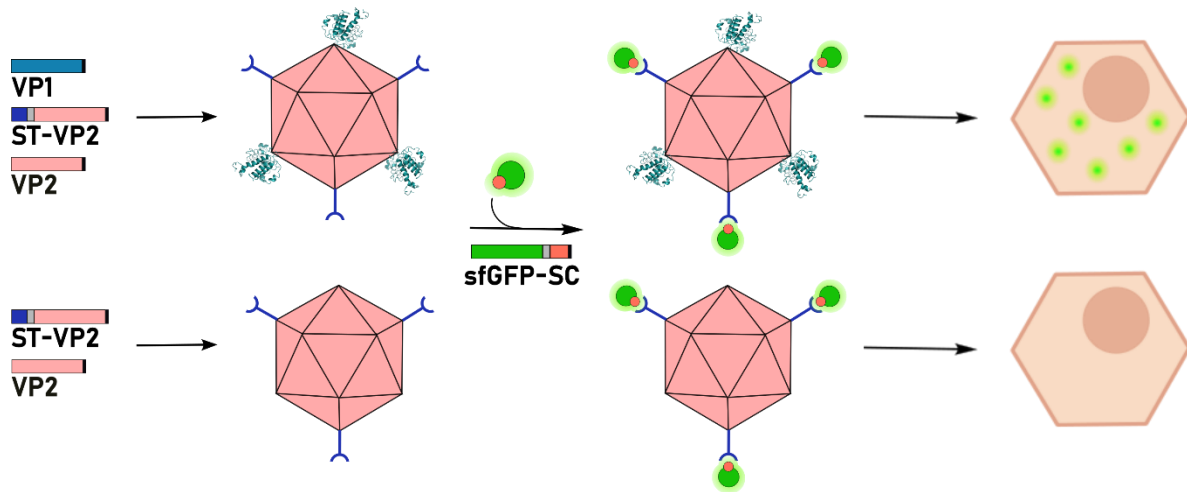


Fig. 46. Esquema de trabajo de la internalización en células HepG2 de las VLPs funcionalizadas con sfGFP-SC, que contienen o no a la proteína estructural VP1.

Las VLPs se ensamblaron en las condiciones antes descritas y se analizaron por DLS para garantizar el término del co-ensamble (Fig. 47).

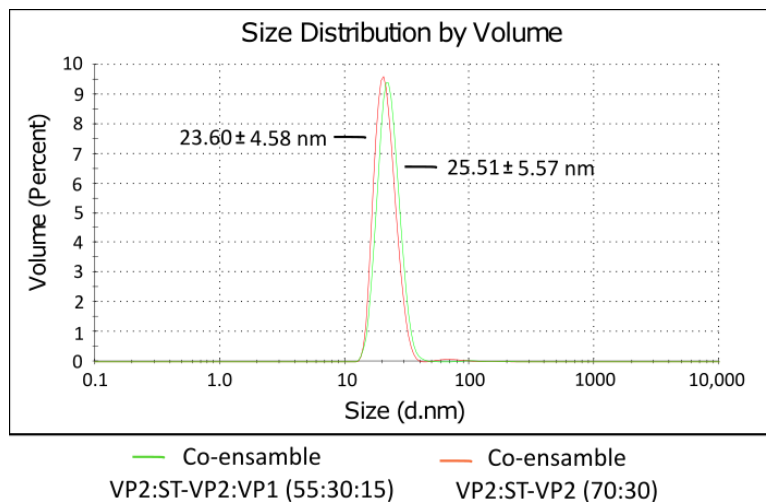


Fig. 47. Promedio del análisis de dispersión dinámica de luz para el co-ensamble VP2: ST-VP2 (70:30) y el co-ensamble VP2: ST-VP2: VP1 (55:30:15).

La Figura 47 muestra en el mismo gráfico las mediciones promedio de ambos tipos de partícula: ST-VP2:VP2:VP1 (30:55:15) y ST-VP2:VP2 (30:70). Una vez corroborada la presencia de VLPs, con un diámetro de partícula característico a las partículas anteriormente descritas, se incubaron con la proteína sfGFP-SC a 27° C durante 3 h, para su posterior incubación con las células HepG2 (Fig. 48).

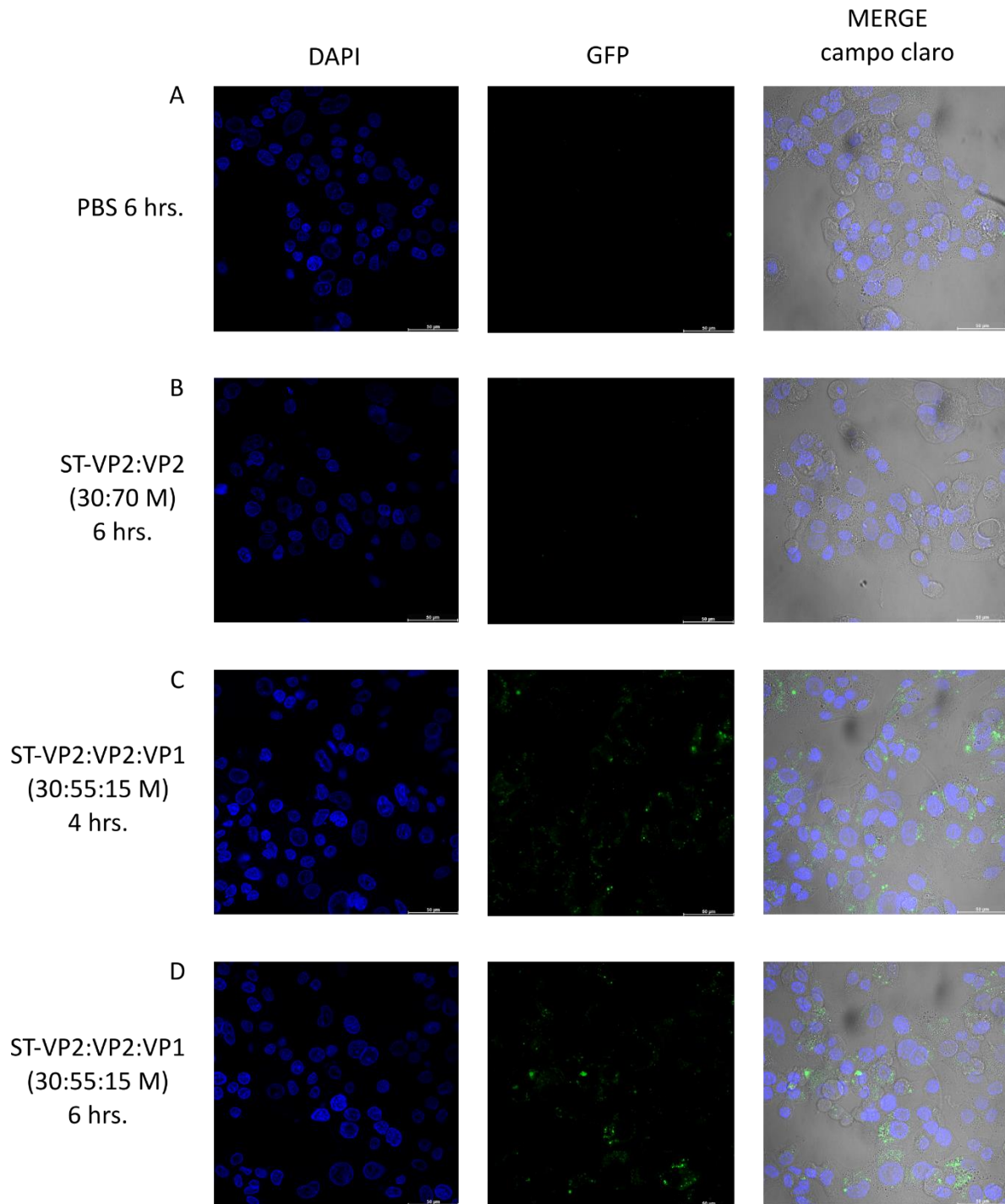


Fig. 48. Ensayos de internalización de las VLPs funcionalizadas con sfGFP en células HepG2. Panel A: células HepG2 tratadas durante 6 h con PBS-Arg 0.2 M. Panel B: Células HepG2 tratadas durante 6 h con VLPs co-ensambladas VP2: ST-VP2 (70:30). Panel C: Células HepG2 tratadas durante 4 h con las VLPs del co-ensamble VP2: ST-VP2: VP1 (55:30:15). Panel D: Células HepG2 tratadas durante 6 h con las VLPs del co-ensamble VP2: ST-VP2: VP1 (55:30:15). El núcleo de las células fue teñido con DAPI. Todos los co-ensambles fueron funcionalizados durante 3 horas a 27 °C con sfGFP-SC.



La Figura 48 muestra los resultados obtenidos mediante microscopía confocal, usando diferentes láseres para la excitación de los fluoróforos utilizados (DAPI para el núcleo celular y sfGFP para las VLPs), después de incubar las VLPs durante 4 y 6 horas con las células HepG2 a 37 °C. Se aprecia únicamente, en las células tratadas con las VLPs que contenían a la proteína VP1, la señal de fluorescencia verde correspondiente a la proteína sfGFP, esto después de los lavados con tripsina al 0.5% realizados durante la preparación de las muestras. Este resultado corrobora que las VLPs del co-ensamble que contiene VP1 logran la internalización desde las 4 horas de tratamiento, incrementándose la señal a las 6 horas post interacción.

Así mismo el resultado anterior suma evidencia acerca del tropismo de las VLPs del B19V que contienen VP1 hacia células hepáticas, lo que incrementa su potencial para utilizarse como plataforma para la entrega sitio específica de biomoléculas de interés.

La internalización de las VLPs en las células HepG2 demuestra que no solo el dominio con actividad de fosfolipasa tipo 2 presente en la región única de VP1 se encuentra correctamente plegado, sino que, además, los sitios de interacción que intervienen en el mecanismo de internalización celular se encuentran accesibles y con su conformación funcional.

## CONCLUSIONES.

Con los datos obtenidos en este trabajo, se confirmó que es posible obtener de manera *in vitro*, VLPs a partir de la proteína estructural VP1. Adicionalmente, se consiguió incorporar la proteína VP1 en co-ensambles de diferentes quimeras de la proteína VP2, obteniendo en este último caso cápsides de tamaños similares a los del virión nativo o las VLPs de VP2.

Se comprobó que tanto el dominio con actividad de PLA<sub>2</sub> como los sitios de reconocimiento de receptores, necesarios para la internalización celular, se encuentran correctamente plegados y expuestos en las partículas que presentan la proteína estructural VP1.

Los resultados obtenidos colocan a las VLPs del B19V que contienen VP1 como una opción biotecnológica para el direccionamiento/internalización celular de fármacos relacionados al tratamiento de enfermedades hepáticas

## PERSPECTIVAS.

La obtención de VLPs a partir de la proteína VP1 y el encontrar la presencia de un polimorfismo inusual en estas, sugiere que se podrían estar incorporando diferentes cantidades monómeros en la cápside, como se ha descrito para otros virus icosaédricos. Para poder dilucidar este fenómeno se requieren de estudios estructurales, lo que implica, optimizar el método de obtención de las VLPs o en su defecto optimizar la purificación de las diferentes especies, por ejemplo, implementado un paso adicional de ultra-centrifugación con gradientes de sacarosa.

Adicional a los métodos estructurales como, la crio-microcopia de transmisión electrónica (CryoEM), el uso de técnicas como la ELISA utilizando el anticuerpo específico para la VP1u permitiría determinar la cantidad de VP1u externalizadas y correctamente plegadas por tipo de población.

El estudio de termo-estabilidad realizado a las VLPs de VP1 sugiere que aquellas partículas con mayor tamaño son más estables al aumento de temperatura, por lo menos en 10 °C (datos no mostrados). Sin embargo, es necesario pulir estos experimentos y homogenizar las condiciones para poder comparar estas partículas con aquellas VLPs que no contienen a la proteína VP1.

Aun cuando se demostró que la actividad de fosfolipasa tipo 2, intrínseca de VP1u, no genera la ruptura de la membrana celular (eritrocitos y células HepG2), si tiene potencial de generar reacciones adversas ya sea cutáneas o inmunológicas, por lo que se sugiere hacer las pruebas pertinentes en un modelo murino para evaluar este riesgo si se desea aplicar la tecnología. Si fuese este el caso, la solución podría estar en mutar uno de los aminoácidos catalíticos para abolir la actividad completamente, lo que sería ideal para las enfermedades lisosomales, como la enfermedad de Pompe, ya que las cápsides perderían su propiedad de liberarse del lisosoma. Esta alternativa quizá no se viable para aquellas enfermedades en donde el blanco sea el citoplasma o núcleo celular, en este caso se podría optar por la decoración de las VLPs con polietilenglicol (PEG) el cual podría ayudar a evadir el sistema inmune.

La especificidad de las VLPs con VP1 a hepatocitos debería ser corroborada con otras líneas celulares y de preferencia corroborarla en un modelo murino, en los cuales las reacciones adversas, si existiesen, se harían notar para optimizar el sistema.



## REFERENCIAS.

1. Gallinella. G. Parvovirus B19 Achievements and Challenges. *ISRN Virology*. 2013; 2013: 1-33.
2. Manaresi. E. and Gallinella. G. Advances in the Development of Antiviral Strategies against Parvovirus B19. *Viruses*. 2019; 11(659): 2-21.
3. Kerr. J. Parvoviruses. London; New York: Hodder; Arnold Distributed in the United States of America by Oxford University Press. 2006.
4. Gilbert. L. et al. Molecular and structural characterization of fluorescent human parvovirus B19B virus-like particles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005; 331: 527-535.
5. Kaufmann. B., Simpson. A., Rossmann. M. The structure of human parvovirus B19. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. 2004; 101(32): 11628-11633.
6. Zhang. R, Cao. L, Cui. M, Sun. Z, Hu. M et al. Adeno-associated virus 2 bound to its cellular receptor AAVR. *Nature Microbiology*. 2019; 4(4): 675-682.
7. Guerra. P, Valbuena. A, Querol-Audí. J, Castellanos. M, Rodríguez-Huete. A et al. Structural basis for biologically relevant mechanical stiffening of a virus capsid by cavity-creating or space-filling mutations. *Scientific Reports*. 2017; 7 (1): 1-13.
8. Simpson. A, Chandrasekar. V, Hébert. B, Sullivan. G, Rossmann. M, Parrish. C Host range and variability of calcium binding by surface loops in the capsid of canine and feline parvovirus. *Journal of Molecular Biology*. 2000; 300(3): 597-610.
9. Kaufmann. B, Chipman. P, Kostyuchenko. V, Modrow. S, Rossmann. M. Visualization of the externalized VP2 N termini of infect human parvovirus B19. *Journal of Virology*. 2008; 82(15): 7306-7312.
10. Ashkenazy H, Abadi. S, Martz E, Chay O, Mayrose I, Pupko T et al. ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Research*. 2016; 44(W1): W344-W350.
11. Celniker G, Nimrod G, Ashkenazy H, Glaser F, Martz E, Mayrose I et al. ConSurf: Using Evolutionary Data to Raise Testable Hypotheses about Protein Function. *Israel Journal of Chemistry*. 2013; 53(3-4): 199-206.
12. Canaan. S, Zádori. Z, Ghomashchi. F, Bollinger. J, Sadilek. M, Moreau. M et al. Interfacial Enzymology of Parvovirus Phospholipases A<sub>2</sub>. *Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279 (15): 14502-14508.
13. Zádori. Z, Szelei. J, Lacoste. M, Li. Y, Gariépy. S, Raymond. S. A Viral Phospholipase A<sub>2</sub> Is Required for Parvovirus Infectivity. *Developmental Cell*. 2001; 1(2): 291-302.

14. Filippone. C, Zhi. N, Wong. S, Lu. J, Kajigaya. S, Gallinella. G et al. VP1u phospholipase activity is critical for infectivity of full-length parvovirus B19 genomic clones. *Virology*. 2008; 374: 444-452.
15. Leisi. R, Ruprecht. N, Kempf. C, Ros. C. Parvovirus B19 Uptake Is a Highly Selective Process Controlled by VP1u, a Novel Determinant of Viral Tropism. *Journal of Virology*. 2013; 87 (24): 13161-13167.
16. Leisi. R, Di Tommaso. C, Kempf. C and Ros. C. The Receptor-Binding Domain in the VP1u Region of Parvovirus B19. *Viruses*. 2016; 8(61): 1-16.
17. Gutiérrez. M., López. S. Mecanismos de entrada de virus: Una manera de conocer a la célula. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 2010; 13(1): 26-33.
18. Quattrocchi. S, Ruprecht. N, Bonch. C, Bieli. S, Zuercher. C, Boller. K et al. Characterization of the early steps of human parvovirus B19 infection. *Journal of Virology*. 2012; 86(17): 9274-9284.
19. Bönsch. C, Zuercher. C, Lieby. P, Kempf. C, Ros. C. The globoside receptor triggers structural changes in the B19virus capsid that facilitate virus internalization. *Journal of Virology*. 2010; 84(22): 11737-11746.
20. Leisi. R., Von Nordheim. M., Ros. C and Kempf. C. The VP1u receptor restricts Parvovirus B19 uptake to permissive erythroid cells. *Viruses*. 2016; 8(265): 2-15.
21. Chipman. P, Agbandje-McKenna. M, Kajigaya. S, Brown. K, Young. N, Baker. T et al. Cryo-electron microscopy studies of empty capsids of human parvovirus B19 complexed with its cellular receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996; 93(15): 7502-7506.
22. Weigel-Kelley. K, Yoder. M and Srivastava. A.  $\alpha 5\beta 1$  integrin as a cellular coreceptor for human parvovirus B19: requirement of functional activation of  $\beta 1$  integrin for viral entry. *Blood*. 2003; 102(12): 3927-3933.
23. Bieri. J and Ros. C. Globoside is Dispensable for Parvovirus B19 Entry but Essential at a Postentry Step for Productive Infection. *Journal of Virology*. 2019; 93(20): 1-15.
24. Munakata. Y., Saito-Ito. T., Kamura-Ishii. K., Huang. J., Kodera. T., Ishii. T. et al. Ku80 autoantigen as a cellular coreceptor for human parvovirus B19 infection. *BLOOD*. 2005; 106(10): 3449-3456.
25. Vihinen-Ranta. M, Yuan. W, Parrish. C. Cytoplasmic trafficking of the canine parvovirus capsid and its role in the infection and nuclear transport. *Journal of Virology*. 2000; 74(10): 4853-4859.
26. Kobiler. O, Drayman. N, Butin-Israeli. V, Oppenheim. A. Virus strategies for passing the nuclear envelope barrier. *Nucleus*. 2012; 3(36): 526-539.
27. Boisvert. M, Bouchard-Lévesque. V, Fernandes. S, Tijssen. P. Classic nuclear localization signals and a novel nuclear localization motif are

- required for nuclear transport of porcine parvovirus capsid proteins. *Journal of Virology*. 2014; 88(20): 11748-11759.
28. Liu. P, Chen. S, Wang. M, Cheng. A. The role of nuclear localization signal in parvovirus life cycle. *Virology Journal*. 2017; 14(1): 1-6.
29. Pillet. S, Annan. Z, Fichelson. S, Morinet. F. Identification of a nonconventional motif necessary for the nuclear import of the human parvovirus B19 major capsid protein (VP2). *Virology*. 2003; 306(1): 25-32.
30. Tu. M, Liu. F, Chen. S, Wang. M, Cheng. A. Role of capsid proteins in parvovirus infection. *Virology Journal*. 2015; 12(1): 1-8.
31. García. G, García. A. Fosfolipasas A2: Grandes Familias y Mecanismos de Acción. *Repertorio de Medicina y Cirugía*. 2009; 18(4): 199-209.
32. Edwards. S, Thompson. D, Baker. S, Wilton. D. The crystal structure of the H48Q active site mutant of human group IIA secreted phospholipase A<sub>2</sub> at 1.5 Å resolution provides an insight into the catalytic mechanism. *Biochemistry*. 2002; 41(52): 15468- 15476.
33. Dorsch. S., Liebisch. G., Kaufmann. B., Von Landenberg. P., Hoffmann. J., Wolfgang. D. and Modrow. S. The VP1 unique region of parvovirus B19 and its constituent phospholipase A<sub>2</sub>-like activity. *J. Virol*. 2002; 76: 2014-2018.
34. Torchilin. V. Multifunctional nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012; 64: 302-315.
35. Sánchez-Rodríguez. S, Münch-Anguiano. L, Echeverría. O, Vázquez-Nin. G, Mora-Pale. M, Dordick. J., and Bustos-Jaimes. I. Human parvovirus B19 virus-like particles: *In vitro* assembly and stability. *Biochimie*. 2012; 94(3): 870-878.
36. Sánchez-Rodríguez. S., Morán-García. A., Bolonduro. O., Dordick. J., and Bustos-Jaimes. I. Enhanced assembly and colloidal stabilization of primate erythrovirus 1 virus-like particles for improved surface engineering. *Acta Biomaterialia*. 2016; 35: 206-214.
37. Gutiérrez-Landa. I. Estudio de la quimera formada por la proteína VP2 del Parvovirus B19 y la Lipasa de *Bacillus pumilus* [Tesis]. México, D.F: UNAM. Facultad de Química; 2014.
38. Coffeen-Cruz. C. Presentación del péptido SpyTag sobre la superficie de partículas tipo virus como un sistema de acoplamiento a proteínas [Tesis]. Cd. de México: UNAM. Facultad de Ciencias; 2018.
39. Cayetano-Cruz. M, Coffeen. C, Valadez-García. J, Montiel. C, Bustos-Jaimes. I. Decoration of virus-like particles with an enzymatic activity of biomedical interest. *Virus Research*. 2018; 255: 1-9.
40. Bustos-Jaimes. I, Soto-Román. A, Gutiérrez-Landa. I, Valadez-García. J, Segovia-Trinidad. C. Construction of protein-functionalized virus-like particles of parvovirus B19. *Journal of Biotechnology*. 2017; 263: 55-63.
41. Sanchez-Rodriguez. S, Enrriquez-Avila. J, Soto-Fajardo. J, Peña-Montes. C, Bustos-Jaimes. I. In Vitro Encapsulation of Heterologous

- dsDNA Into Human Parvovirus B19 Virus-Like Particles. *Molecular Biotechnology*. 2014; 57(4): 309-317.
42. Segovia-Trinidad. C. Construcción y Caracterización de Partículas Tipo Virus Multifuncionales de Parvovirus B19 [Tesis]. Cd. de México: UNAM. Maestría en Ciencias Bioquímicas; 2018.
  43. Santillán-Uribe. H. Construcción y Caracterización de Estructuras Supramoleculares Basadas en el Parvovirus B19 [Tesis]. Cd. de México: UNAM. Maestría en Ciencias Bioquímicas; 2017.
  44. Brune. K, Leneghan. D, Ishizuka. A, Bachmann. M, Draper. S et al. Plug-and-Display: decoration of Virus-Like Particles via isopeptide bonds for modular immunization. *Scientific Reports*. 2016; 6(1):19234.
  45. Veggiani. G, Zakeri. B, Howarth. M. Superglue from bacteria: Unbreakable Bridges for Protein Nanotechnology. *Trends in Biotechnology*. 2014; 32(10): 506-512.
  46. Reddington. S, Howart. M. Secrets of a covalent interaction for biomaterials and biotechnology: SpyTag and SpyCatcher. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2015; 29: 94-99.
  47. Li. L, Fierer. J, Rapoport. T, Howart. M. Structural analysis and optimization of the covalent association between SpyCatcher and a peptide Tag. *Journal of Molecular Biology*. 2014; 426(2): 309-317.
  48. Zhang. Y. I-TASSER: Fully automated protein structure prediction in CASP8. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2009; 77(S9): 100-113, 2009.
  49. Roy. A, Yang. J, Zhang. Y. COFACTOR: an accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation. *Nucleic Acids Research*. 2012; 40(W1): W471-W477.
  50. Yang. J, Zhang. Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Research*. 2015; 43(W1): W174-W181.
  51. <http://robeta.bakerlab.org>
  52. Xu. D, Zhang. Y. Ab initio protein structure assembly using continuous structure fragments and optimized knowledge-based force field. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*. 2012; 80: 1715-1735.
  53. Xu. D, Zhang. Y. Toward optimal fragment generations for ab initio protein structure assembly. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2012; 81(2): 229-239.
  54. <https://servicesn.mbi.ucla.edu/SAVES>
  55. Wong. S, Momoeda. M, Field. A, Kajigaya. S, Young. N. Formation of Empty B19 Parvovirus Capsids by the Truncated Minor Capsid Protein. *Journal of Virology*. 1994; 68(7): 4690-4694.
  56. Brown. C, Van Lent. J, Vlask. J, Spaan. W. Assembly of empty capsids by using baculovirus recombinants expressing human parvovirus B19 structural proteins. *Journal of virology*. 1991; 65(5): 2702-2706.
  57. Gismera-García. M, Quintana-Mani. M, Da Silva de Campos. M. Introducción a la cromatografía líquida de alta resolución. Editorial Universidad Autónoma de Madrid; 2009.

58. Sun. X, Luo. L, Kuang. Y, Li. P. Nanoseparation using density gradient ultracentrifugation. Singapore: Springer Singapore: 2018.
59. Takeyasu. K. Atomic force microscopy in nanobiology. Singapore: Pan Stanford Publishing: 2016.
60. Monninger. M, Nguessan. C, Blancett. C, Kuehl. K, Rossi. C, Olschner. S et al. Preparation of viral samples within biocontainment for ultrastructural analysis: utilization of an innovative processing capsule for negative staining. *Journal of Virological Methods*. 2016; 238: 70-76.
61. Alonso-Geli. Y, Alonso-Moreno. Y, Falcón-Diéguez. J, Lucambio-Miró. L, Castro-Piñol. M. Caracterización de la fragilidad osmótica de eritrocitos humanos en la anemia drepanocítica. *Revista Cubana de Química*. 2015; 27(2): 110-118.
62. Cayetano-Curz. M, Valadez-Gacía. J, Méndez. C, Bustos-Jaimes. I. Virus-like Nanoparticles Derived from Parvovirus b19 Efficiently Internalize in Human Hepatocytes: A Biocompatible Delivery System for Peptides and Proteins. *ACS Applied Nano Materials*. 2019; 2(10): 6178-6186.
63. Abe. K, Kiuchi. T, Tanaka. K, Edamoto. Y, Aiba. N Sata. T. Characterization of erythrovirus B19 genomes isolated in liver tissues from patients with fulminant hepatitis and biliary atresia who underwent liver transplantation. *International Journal of Medical Sciences*. 2007; 4: 105-109.
64. Poole. B, Karetnyi. Y, Naides. S. Parvovirus B19-Induced Apoptosis of Hepatocytes. *Journal of Virology*. 2004; 78(14): 7775-7783.
65. Poole. B, Zhou. J, Grote. A, Schiffenbauer. A, Naides. S. Apoptosis of Liver-Dereved Cells Induced by Parvovirus B19 Nonstructural Protein. *Journal of Virology*. 2006; 80(8): 4114-4121.
66. Bonvicini. F, Fikippone. C, Manaresi. E, Zerbini. M, Musiani. M, Gallinella. G. HepG2 hepatocellular carcinoma cells are a non-permissive system for B19V virus infection. *Journal of General Virology*. 2008; 89(12): 3034-3038.
67. Mengeling. W, Ridpath. J, Vorwald. A. Size and antigenic comparisons among the structural proteins of selected autonomous parvoviruses. *Journal of General Virology*. 1988; 69(4): 825-837.
68. Maxwell. I, Terrell. K, Maxwell. F. Autonomous parvovirus vectors. *Methods*. 2002; 28(2): 168-181.
69. Cheng. F, Chen. A, Best. S, Bloom. M, Pintel. D, Qiu. J. The capsid proteins of Aleutian Mink disease virus activate caspases and are specifically cleaved during infection. *Journal of Virology*. 2009; 84(6): 2687-2696.
70. Tang. J., Johnson. J., Dryden. K., Young. M., Zlotnick. A., and Johnson. J. The role of subunit hinges and molecular “switches” in the control of viral capsid polymorphism. *Journal of Structural Biology*. 2006; 154(1): 59-67.
71. Sun. J, DuFort. C, Daniel. M, Murali. A, Chen. C, Gopinath. K et al. Core-controlled polymorphism in virus-like particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007; 104(4): 1354-1359.

72. Elrad. O, Hagan. M. Mechanisms of size control and polymorphism in viral capsid assembly. *Nano Letters*. 2008; 8(11):3850-3857.