



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**Ingeniería de proteínas para la presentación de péptidos en la  
superficie de VLPs del parvovirus B19**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
WILLY ANGEL DELGADO TAPIA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Ismael Bustos Jaimes  
[Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dra. Georgina Garza Ramos Martínez  
[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. Enero, 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Jurado asignado:

PRESIDENTE	Rodríguez Romero Adela
VOCAL	González Segura Lilian
VOCAL	García Trejo José de Jesús
VOCAL	González Andrade Martín
SECRETARIO	Fernández Velasco Daniel Alejandro

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

DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE PROYECTO FUI BENEFICIADO CON UNA BECA OTORGADA POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACyT) PARA APOYO A ESTUDIOS DE MAESTRÍA.

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

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

## **Agradecimientos**

A mis padres por su apoyo constante e incondicional para seguir cumpliendo mis metas, por los consejos, el amor y el gran ejemplo que siempre me han dado, que sin lugar a duda siempre los llevo a lo largo de mi vida y me han ayudado a forjar la persona que soy hoy en día.

¡Gracias por todo!

Al Dr. Ismael Bustos Jaimes por proporcionarme los recursos y su apoyo para la culminación de este proyecto, que gracias a su paciencia y asesoría se logró culminar con éxito.

A la Dra. Georgina Garza Ramos Martínez y al Dr. Luis Fernando Olguín Contreras por su asesoría, apoyo y consejos a lo largo del proyecto, para concretarlo satisfactoriamente.

A todos los miembros del jurado por las observaciones y contribuciones que enriquecieron este escrito.

A todos mis amigos del grupo de trabajo: Hugo, Carlos, Lolita, Jorge, Iris, Maribel, Lourdes, Javier e Ignacio. Gracias por todas esas horas que me dieron de su tiempo para conocerlos, los consejos, las pláticas que tuvimos, las jornadas largas en el laboratorio y esa gran convivencia que siempre disfrute entre nosotros.

A la M.C. Josefina Valadez García, gracias por tu gran dedicación al trabajo del laboratorio y pasar tantas horas frente al microscopio.

A todos mis amigos y compañeros del LFQIP: Ricardo, Sergio R., Esaú, Hugo L., Fátima, Renan, Alex, Eréndira, Cinthya, Manuel, Eloy y Renan. Siempre fue gratificante pasar tiempo con ustedes, y seguir aprendiendo con ustedes del magnífico mundo de las proteínas.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>2</b>
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
Hipótesis .....	17
Objetivo general .....	17
Objetivos particulares.....	17
<b>3. METODOLOGÍA.....</b>	<b>18</b>
Esquema general de trabajo .....	18
<b>Métodos .....</b>	<b>19</b>
Subclonación .....	19
Obtención de células transformantes de <i>E. coli</i> BL21(DE3) .....	20
Sobreexpresión de las proteínas.....	23
Obtención de las proteínas ST- VP2-CP69, ST-VP2 y VP2 en cuerpos de inclusión.....	24
Purificación de las proteínas VP2, ST-VP2-CP69 y ST-VP2 .....	25
Purificación de la proteína SC-GFP.....	27
Ensamble y caracterización de VLPs mediante DLS .....	28
Caracterización de VLPs mediante ultracentrifugación isopícnica .....	30
Purificación de VLPs mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC) .....	31
Análisis de VLPs y de estructuras supramoleculares por Microscopía de Fuerza Atómica .....	31
Caracterización de VLPs por Microscopia Electrónica de Transmisión.....	32
Interacción de la proteína ST-VP2-CP69 con el péptido SpyCatcher (SC).....	33
Cinética de interacción entre la proteína quimérica ST-VP2-CP69 y SC-GFP.....	34
Purificación por SEC de VLPs fusionadas a SC-GFP .....	34
Fluorescencia de VLPs quiméricas .....	34
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>35</b>
Subclonación.....	35
Sobreexpresión de la proteína ST-VP2, ST-VP2-CP69 y VP2.....	37
Purificación de las proteínas ST-VP2-CP69, ST-VP2 y VP2.....	38
Sobreexpresión de la proteína SC-GFP .....	40

Purificación de la proteína SC-GFP.....	41
Ensamble de VLPs y caracterización por DLS .....	43
Caracterización de VLPs mediante ultracentrifugación isopícnica .....	45
Purificación de VLPs por SEC.....	47
Caracterización de VLPs por Microscopia de Fuerza Atómica (AFM) .....	49
Caracterización de VLPs por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) .....	49
Interacción de la proteína ST-VP2-CP69 con el péptido SpyCatcher (SC) .....	50
Cinética de interacción entre la proteína quimérica ST-VP2-CP69 y SC-GFP.....	53
Purificación por SEC de VLPs fusionadas a SC-GFP.....	54
Fluorescencia de VLPs quiméricas.....	58
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>63</b>
<b>6. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>63</b>
<b>7. ANEXO.....</b>	<b>64</b>
<b>Materiales.....</b>	<b>64</b>
<b>8. REFERENCIAS.....</b>	<b>67</b>



## Resumen

Las partículas tipo virus (VLPs por sus siglas en inglés), son arreglos supramoleculares de proteínas estructurales de los virus, con gran interés biomédico y biotecnológico dados su tamaño nanométrico, monodispersidad y polivalencia. Estas partículas pueden ser usadas como acarreadores de epítopos inmunogénicos u otras moléculas de interés. Sin embargo, la presentación de péptidos en la superficie puede estar limitada por la exposición de sus extremos N- y C-terminales. En el caso de las VLPs del parvovirus B19 (B19V), el extremo C-terminal se encuentra dentro de la cápside viral, por lo que no puede ser utilizado para la presentación de péptidos. Por su parte, el extremo N-terminal se encuentra solo parcialmente expuesto en la superficie de las VLPs, lo cual reduce significativamente la polivalencia. Se han utilizado diversas estrategias para lograr aprovechar la polivalencia de estas partículas, una de ellas es la presentación de péptidos o proteínas en asas superficiales; sin embargo, algunas proteínas pueden tener problemas en su plegamiento o, función. Una manera de lograr aprovechar completamente la polivalencia de estas partículas es transportar los extremos N- y C-terminales a la superficie de las VLPs, mediante permutaciones circulares. Por lo tanto, en este trabajo, se realizó el coensamble de la proteína VP2 (proteína estructural mayoritaria) de B19V con una forma permutada circularmente de la misma proteína, así como el ensamble de cada una de las proteínas de manera independiente. Estudios preliminares sugirieron que la forma permutada circularmente es capaz de formar VLPs. Sin embargo, no se determinó la exposición de los extremos N-terminales. En este trabajo se modificó el extremo N-terminal de la forma permutada circularmente, para poder identificar y cuantificar su presencia en la superficie de la VLP por medio de una reacción que sería imposible llevar a cabo si el extremo N-terminal estuviera en el interior de la partícula. Para tal fin, se fusionó el péptido SpyTag (ST) al extremo N-terminal de la proteína permutada circularmente, para posteriormente hacerlo reaccionar con su par ortogonal, el dominio SpyCatcher (SC) fusionado a la proteína sfGFP (SC-GFP). ST y SC forman un enlace isopeptídico que puede ser analizado por su migración en gel y por su fluorescencia. Con base a lo obtenido, se logró estimar el número de SC-GFP unidos a ST en cada VLP, comprobando la exposición de los extremos N-terminales en la superficie de las partículas.

## 1. Introducción

Los virus son estructuras supramoleculares, basados en nucleoproteínas, que evolucionaron en nanomáquinas biológicas, capaces de autorreplicarse mediante la maquinaria celular del huésped y propagarse a otras células y organismos. Después de la replicación de sus componentes macromoleculares en la célula huésped, el virión típico debe poder autoensamblarse, madurar en una entidad infecciosa estable, salir de la célula, y resistir agresiones físicas y químicas severas en el entorno extracelular (Chiu *et al.*, 1997). En respuesta a presiones de selección, el proceso de evolución del virus ha logrado agrupar un conjunto notable de características y muchas funciones complejas en estructuras de nucleoproteínas relativamente simples. Gracias al conocimiento y desarrollo de compuestos para bioconjugación, así como el desarrollo de tecnologías para la modificación genética de proteínas, se ha abierto un mundo de posibilidades para el aprovechamiento de las partículas virales en medicina y la industria (Douglas & Young, 1998; Mateu, 2011).

La biología sintética es un campo emergente de investigación cuyo objetivo es hacer de la biología una disciplina de ingeniería, permitiendo así diseñar, controlar y estandarizar procesos biológicos, que pueden ser ajustados y diseñados para fines biomédicos y biotecnológicos (Gamboa *et al.*, 2018). Un claro ejemplo de esto son las partículas tipo virus (VLPs por sus siglas en inglés), las cuales están compuestas de proteínas estructurales de la cápside viral y son semejantes al virus silvestre en su estructura y propiedades antigénicas, pero sin ser infectivas ya que no poseen material genético. Estas partículas son capaces de autoensamblarse, ya sea *in vivo* o *in vitro*. Sin embargo, uno de los principales problemas del autoensamble *in vivo* en sistemas heterólogos procariontes o eucariontes, es que conlleva a la encapsulación de posibles contaminantes que obstaculizaría algunos usos de VLPs en biotecnología o medicina (Brune *et al.*, 2016; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012; Noad & Roy, 2003). El ensamble *in vitro* de VLPs provee un panorama más amplio para su uso en la biología sintética, evitando la encapsulación de contaminantes y permitiendo la encapsulación de proteínas, fármacos o genomas heterólogos de interés (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012). De igual manera, estas partículas han sido

usadas como plataformas para la presentación de péptidos sobre su superficie y de este modo inducir respuesta inmune en el hospedero (Plummer & Manchester, 2011) (Fig. 1).

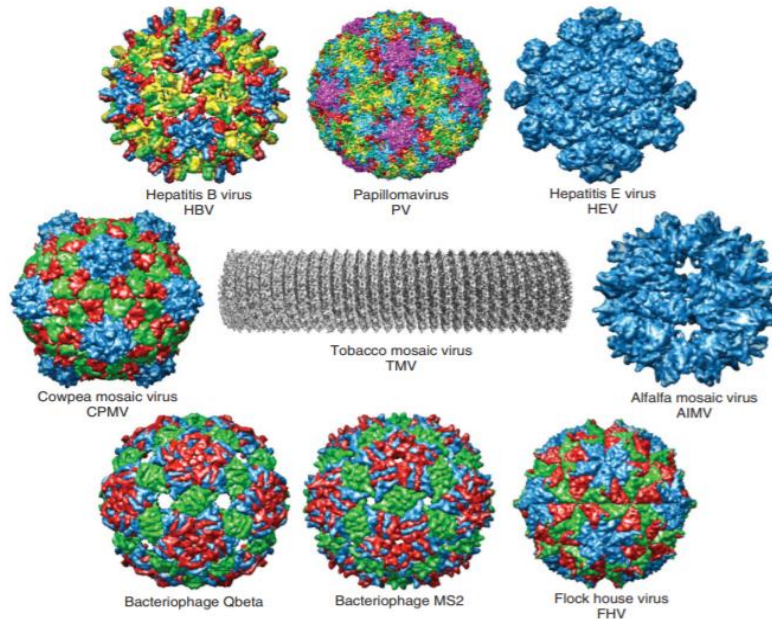


Figura 1. Ejemplos de cápsidas virales que han sido desarrolladas como vacunas de VLPs y plataformas para la presentación de antígenos heterólogos (Plummer & Manchester, 2011).

El uso de las VLPs en estas áreas se debe a que poseen propiedades de gran interés como su monodispersidad y polivalencia, es decir, su tamaño no es muy variable, y al estar constituidas de múltiples subunidades de las mismas proteínas, los grupos reactivos en su superficie se repiten periódicamente con precisión nanométrica. Por lo tanto, al lograr la presentación de un péptido en una proteína estructural de la partícula en su superficie, se logrará presentar el péptido de interés repetidas veces de acuerdo con la polivalencia de la VLP (Blum *et al.*, 2015). Además, la fuerza y selectividad de las interacciones proteína-proteína permiten su uso para la creación de nuevos nanomateriales, siendo excelentes sistemas enlazantes entre nanopartículas y nanocables para generar estructuras más ordenadas y con la capacidad de tener distintas funciones (Soto & Radna, 2010). La gran variedad de aplicaciones de las VLPs en la biotecnología ha incentivado la

búsqueda de proteínas virales capaces de formar estas partículas a partir de sus proteínas estructurales, con el fin de tener un amplio repertorio de herramientas útiles para la encapsulación de fármacos, enzimas o material genético, así como la presentación de péptidos en su superficie para la generación de anticuerpos contra el péptido o la proteína de interés.

El *Parvovirus* B19 (B19V) es uno de los virus que se ha utilizado como modelo para la construcción de VLPs mediante el autoensamble de una de sus proteínas formadoras de la cápside (Kajigaya *et al.*, 1991). El B19V es un virus patógeno para humanos, perteneciente a la familia *Parvoviridae*, género *Erythrovirus*. Es el agente etiológico del eritema infeccioso en niños, crisis aplásicas en pacientes inmunocomprometidos, así como aborto espontáneo e hidropesía fetal no inmune en mujeres embarazadas. El B19V muestra un notable tropismo tisular por células hematopoyéticas humanas del linaje eritroide. Es un virus de apariencia esférica, no envuelto, de 18-25 nm de diámetro, con simetría icosaédrica T1 (Naides, 1999; Rogo *et al.*, 2014).

Las características estructurales del genoma de B19V son comunes para esta familia de virus. Este virus posee un DNA de cadena sencilla, de polaridad positiva o negativa, de 5596 bases en longitud, el cual es encapsulado en viriones isométricos. El genoma viral está compuesto de una región interna única, que contiene todas las secuencias codificantes, flanqueado por dos regiones terminales invertidas repetidas, posee dos marcos de lectura abiertos principales, en la mitad izquierda del genoma codifica la proteína viral no estructural (NS) y en la mitad derecha del genoma codifica las proteínas víricas de la cápside VP1 y VP2. Adicionalmente están presentes dos marcos de lectura menores en el centro y el extremo derecho del genoma posiblemente codificando para proteínas no estructurales más pequeñas (Fig. 2) (Gallinella, 2013).

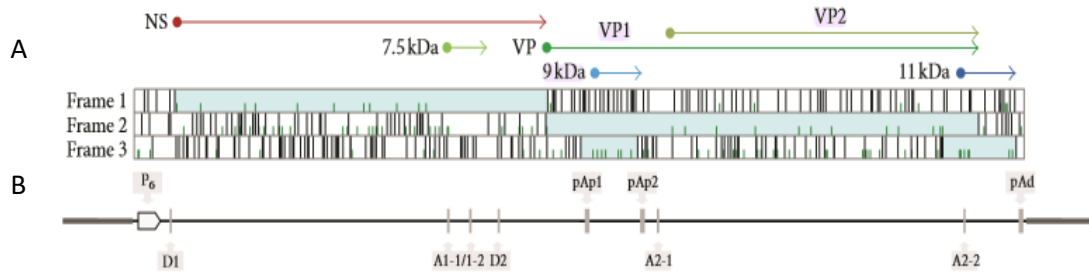


Figura 2. Representación esquemática y organización del genoma de B19V. A: Marcos de lectura abiertos identificados en la cadena positiva del genoma, las flechas indican las regiones codificantes para proteínas virales situadas sobre el mapa de ORFs. B: Organización del genoma con una representación distinta de las regiones internas y terminales e indicando las posiciones del promotor (P6), donador de empalme (D1, D2), aceptor de empalme (A1-1/2, A 2-2/2), y sitio de escisión de poliadenilación (pAp1, pAp2 y pAd) (Gallinella, 2013).

El virión está compuesto de 60 subunidades, tanto de VP1, la cual se encuentra en una proporción del 5%, como de VP2, con una proporción del 95% en la cápside viral, con pesos moleculares de 84 y 58 kDa respectivamente. La estructura central del monómero está formada por la región común VP, formada por un barril beta clásico, con ocho hebras conectadas por grandes asas que se proyectan sobre la superficie exterior y determinan su topografía y estructuras específicas en los ejes de simetría 5, 3 y 2. Al igual que otros parvovirus, el B19V tiene una estructura cilíndrica en el eje de orden 5, formando un canal cerrado que conecta la superficie interior y exterior del virión, rodeado por una depresión tipo cañón. En contraste con otros parvovirus, el B19V carece de picos prominentes alrededor del eje de simetría de orden 3 y tiene una superficie redondeada general, de apariencia lisa. Al comparar las VLPs de B19V formadas exclusivamente por VP2 con los viriones nativos, la mayor diferencia está alrededor del eje de simetría de orden 5, lo que sugiere que en los viriones o en las cápsides vacías, el canal cilíndrico está normalmente bordeado por el N-terminal de las proteínas VP2, mientras que en las VLPs hay una densidad electrónica difusa por dentro del canal que podría

corresponder a los extremos N-terminales de VP2 que no atravesaron este canal (Gallinella. 2013; Kaufmann *et al.*, 2004, 2008).

VP1 es idéntica a VP2, excepto por una región N-terminal de 227 residuos adicionales en VP1, la llamada región única de VP1 (VP1u). Los virus de la familia *Parvoviridae* poseen actividad fosfolipasa en la región única de VP1. B19V no es la excepción, posee actividad de fosfolipasa intrínseca, probablemente necesaria para que pueda ser efectiva la infección al hospedero, por lo que su disposición topográfica y dinámica podría ser crucial para lograr la interacción productiva de los viriones con las células diana. La localización topológica de VP1 sobre la cápside ha estado en debate ya que su actividad de fosfolipasa no puede ser detectada en viriones recién producidos, sugiriendo que VP1u no se encuentra en la superficie de la cápside y solo se muestra después de la exposición a condiciones ácidas o a temperatura elevada (Ros *et al.*, 2006). Trabajos previos indican que B19V externaliza VP1u al unirse a las células precursoras eritroides, probablemente a través del poro que se encuentra en el eje de simetría de orden cinco del virus, desplegando su actividad de fosfolipasa, que podría facilitar los últimos pasos de internalización al virus (Bönsch *et al.*, 2010). También se ha planteado el posible mecanismo de unión e internalización del virus a partir de trabajos previos que mencionan principalmente dos receptores indispensables para la entrada a la célula, el globósido (Gb4Cer) y la integrina  $\alpha 5\beta 1$ , además del autoantígeno Ku80 como un probable correceptor celular para la infección de este parvovirus, facilitando la unión a ciertos tipos celulares (Bönsch *et al.*, 2010; Munakata *et al.*, 2005; Weigel-Kelley *et al.*, 2003, 2006). Sin embargo, más recientemente, Leisi y colaboradores (2013) estudiaron el papel que juega VP1u en la entrada e internalización del virus, mediante distintas versiones recombinantes de longitud completa y truncadas de VP1u, así como ensayos de internalización en diferentes células permisivas para B19V, para demostrar el papel del receptor de VP1u en la internalización de B19V. Los resultados les permitieron sugerir que la fosfolipasa no es esencial para el proceso de internalización, debido a que utilizaron una versión truncada en el residuo 128 de la región carboxilo de VP1u, que en consecuencia no tiene el dominio de fosfolipasa, y que sigue siendo capaz de unirse a la membrana

celular para después poder internalizarse a la célula. Ellos también determinaron, mediante cortes en diferentes regiones de VP1u, el papel fundamental que juega éste en el estrecho tropismo de B19V al controlar un proceso de entrada altamente selectivo. Posteriormente, para localizar el dominio de unión al receptor en la región de VP1u, analizaron los efectos de distintas versiones truncadas y mutaciones sobre la capacidad de internalización de la proteína recombinante en células UT7/Epo, y lograron determinar que los aminoácidos 5-80 de la región N-terminal son necesarios y suficientes para la unión e internalización celular (Leisi *et al.* 2016). Subsecuentemente, Bieri y Ros (2019), lograron discernir el papel del Globósido (Gb4Cer) en el ciclo de vida del B19V. Como se mencionó anteriormente, Gb4Cer es considerado el receptor primario del parvovirus B19. Sin embargo, su expresión no correlaciona bien con el acoplamiento y el tropismo selectivo del virus. Mediante el *knock out* (KO) del gen B3GalNT1, que codifica para la enzima globósido sintasa en células UT7/Epo y que ayuda a sintetizar al receptor Gb4 en este linaje celular, descubrieron que no hubo cambios en la unión al virus y su internalización a la célula KO. Sin embargo, la transcripción de NS1 falló, y consecuentemente la replicación y expresión de la proteína de la cápside fue eliminada. Estos estudios demostraron que Gb4 no es realmente una parte fundamental en el mecanismo de unión e internalización del parvovirus B19V, pero es esencial para la infección productiva al huésped (Bieri y Ros, 2019).

Por otro lado, está bien establecido que VP1 no es requerida para la formación de la cápside (Kajigaya *et al.*, 1991; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012, 2014). Una contribución importante de Kaufmann y *colaboradores* en el 2004 fue la obtención de la estructura tridimensional por cristalografía de rayos x de VLPs ensambladas únicamente con la proteína VP2 (Fig. 3) (PDB 1S58), facilitando de esta manera el estudio estructural de las VLPs y permitiendo plantear nuevas estrategias para modificaciones mediante ingeniería de la proteína VP2.

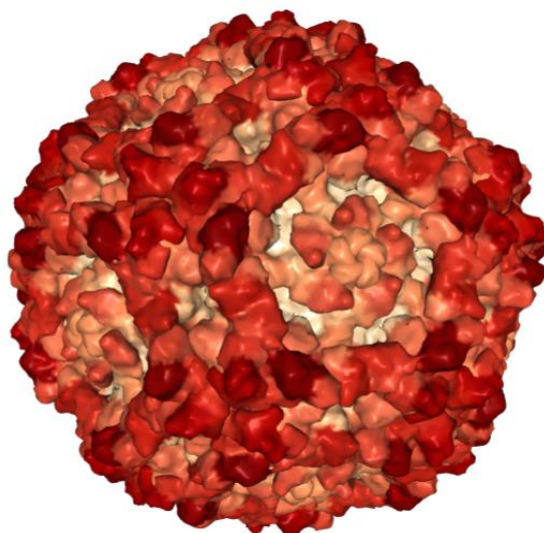


Figura 3. Modelo de la estructura cristalográfica de la partícula tipo virus del B19V ensamblada solo por la proteína VP2, indicando en escala de rojos el valor del desplazamiento atómico o factor B de la proteína. Un rojo más intenso indica que el valor del factor B aumenta y a un rojo más claro disminuye (PDB 1S58).

La proteína estructural mayoritaria de la cápside, VP2, está compuesta por 554 aminoácidos, los cuales se observan en la estructura cristalográfica, excepto por los 19 residuos del extremo N-terminal y 13 residuos del asa 301-313 presente en la superficie de la VLP, que es adyacente al eje de simetría de orden tres en el virión. Esto sugiere que el asa 301-313 es muy móvil y no es indispensable para el plegamiento de la proteína o el ensamble de las VLPs. VP2 posee una estructura que contiene un barril  $\beta$  de ocho hebras antiparalelas. Cabe destacar que aproximadamente dos tercios de la estructura de la proteína VP2 está compuesta de asas y giros que conectan las hebras del barril  $\beta$  mostradas en gris en la figura 4. La cápside está estabilizada por el ensamble de moléculas VP2 vecinas, donde las asas 3 y 4 que conectan las hebras G y H de una subunidad están interconectadas con el asa 1 que conecta las hebras BC y una porción del asa GH de una subunidad triple relacionada con la simetría triple (Fig. 4). El extremo C-terminal no se encuentra visible en la superficie de la cápside y los extremos N-terminal se observan en la superficie de la cápside por el poro del eje de orden cinco en B19V silvestre (Kaufmann *et al.*, 2004, 2008).



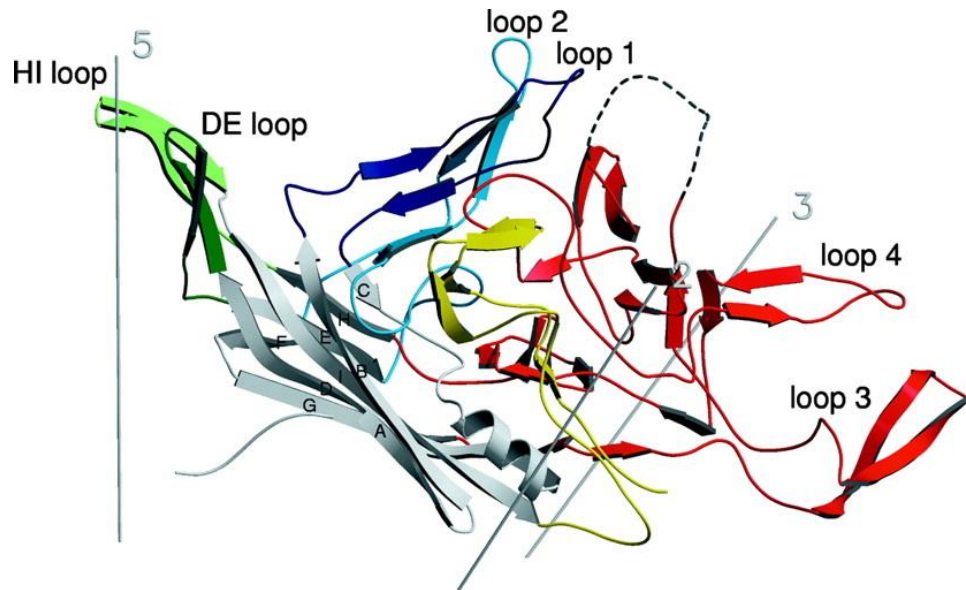


Figura 4. Representación de listón de la proteína VP2 de B19V (PDB 1S58) (Kaufmann *et al.*, 2004).

Las VLPs del B19V se pueden obtener a partir del autoensamble *in vivo* exclusivamente de la proteína VP2, o de la expresión de VP2 y VP1 en sistemas heterólogos. Sin embargo, uno de los principales problemas del ensamble *in vivo* de cualquier VLP es que puede retener contaminantes, esto llevó a nuestro grupo de trabajo a determinar las condiciones para realizar el ensamble *in vitro* de VLPs de B19V, lo que garantizaría la ausencia de contaminantes en el interior de las VLPs y logrando el control del ensamblaje (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012). De igual manera se ha logrado la encapsulación de DNA de cadena doble en B19V con el fin de presentar una estrategia para abrir la posibilidad del uso de las VLPs de B19V como sistemas de liberación con futuras aplicaciones terapéuticas (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2015). Además, se ha realizado la presentación de péptidos en la superficie de VLPs de B19V mediante su fusión al extremo N-terminal de la proteína VP2, como son los péptidos de la glicoproteína de fusión del virus sincicial respiratorio (Morán-García *et al.*, 2016). Sin embargo, se ha demostrado que en VLPs de B19V no se externalizan todos los extremos N-terminales teóricos en la superficie del poro formado en el eje de orden 5 (Fig. 5) (Brown *et al.*, 1994; Gilbert *et al.*, 2005; Kaufmann *et al.*, 2008).

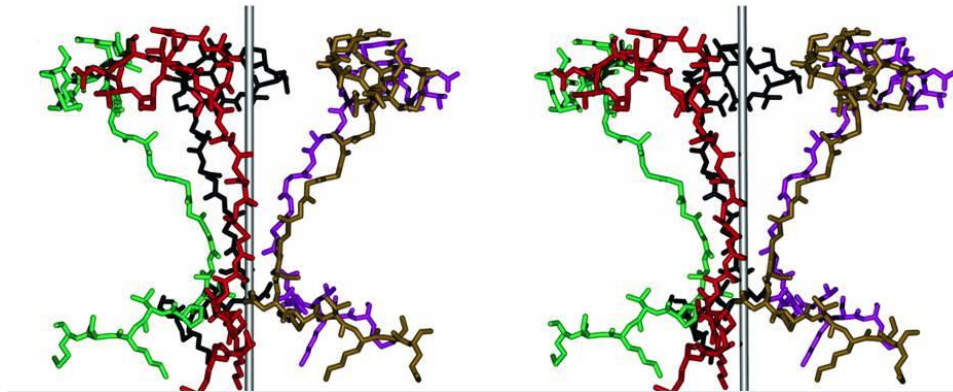


Figura 5. Representación estereoscópica de la reconstrucción de los extremos amino terminales de VP2 de B19V dentro del poro formado en el eje de simetría de orden cinco de la cápside, el cual muestra que es espacialmente posible que todos los extremos N- terminal se externalicen al mismo tiempo (Kaufmann *et al.*, 2008).

En consecuencia, se ha implementado la utilización de asas superficiales como puntos de unión para péptidos y de esta manera aprovechar la polivalencia de las VLPs. No obstante, la presentación de péptidos en el asa puede llegar a comprometer el plegamiento correcto de la proteína de interés (Santillán-Uribe *et al.*, 2015).

Otra estrategia para aprovechar el potencial polivalente de estas partículas es cambiar el extremo N-terminal de las VLPs a la posición de un asa superficial por permutación circular. Una proteína permutada circularmente, posee los extremos N- y C- terminales nativos conectados vía un enlazador peptídico corto, y se introducen nuevos extremos terminales en un sitio secundario en otra parte de la secuencia polipeptídica (Terasaka *et al.*, 2018). Esta estrategia se ha utilizado extensamente para cambiar la conectividad de elementos de estructura secundaria en una proteína, manteniendo la forma tridimensional general. Este tipo de reordenamiento topológico ha sido observado en proteínas formadoras de VLPs, y se puede emplear para la ingeniería de proteínas permitiendo la modificación de la morfología de la partícula. Por ejemplo, la proteína de la cápside del bacteriófago AP205 es una permutación circular natural de la proteína del bacteriófago MS2 (Shishovs *et al.*, 2016). Mediante el uso de esta táctica, en nuestro grupo se modificó el

ordenamiento de los extremos terminales de VP2 (Herrera, datos no publicados). Se usó la herramienta bioinformática CPred (<http://sarst.life.nthu.edu.tw/CPred>) para el análisis de la estructura de la proteína VP2. Se escogió el residuo 69, ya que presentó la mayor probabilidad de ser un buen punto para introducir una permutación circular (0.775 en escala de 0 a 1). Se eliminaron los primeros 22 residuos de aminoácidos del extremo N-terminal, ya que no son esenciales para el ensamble de VLPs de este virus y se insertó un péptido que serviría de puente entre el extremo C-terminal original, y el residuo 23 de la VP2. Este péptido puente tiene la secuencia EGG SGG SGG SGG SGG SGG SGG SGG SGG, que debería ser suficientemente largo para que se cubra la distancia existente entre el residuo 23 y el extremo C-terminal de la VP2 (= 55.6 Å). En el nuevo extremo N-terminal se adicionó la secuencia MGGSGGSGGSGG, en el que, a nivel de DNA, hay un sitio de restricción para la endonucleasa de restricción *Bam*HI, que permitiría posibles modificaciones en el futuro. Finalmente, en el extremo C-terminal se le colocó una etiqueta de 6xHis, para facilitar su purificación. El gen fue sintetizado químicamente tomando en cuenta los codones necesarios para la expresión de la proteína en *E. coli*, y se insertó en el vector de expresión pET22b(+). Se encontró que la proteína VP2 permutada en el residuo 69 (VP2-CP69) tiene la capacidad de formar VLPs, de acuerdo con su caracterización mediante Dispersión Dinámica de Luz (DLS por sus siglas en inglés) y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM por sus siglas en inglés) (Herrera, datos no publicados). Sin embargo, no se comprobó que los extremos N- y C-terminales se encontraran expuestos en la superficie de la partícula. Es de gran interés demostrar que la forma permutada de la proteína VP2 realmente presenta sus extremos terminales en la superficie de las VLPs, por su relevancia tecnológica. Para ello sería necesario un método que nos permita determinar experimentalmente o predecir dichos elementos estructurales.

Una estrategia innovadora que se ha utilizado para la construcción de biomateriales y la biotecnología es el acoplamiento a través de un sistema denominado SpyTag/SpyCatcher. Éste tiene la capacidad de interactuar ortogonalmente y formar un enlace isopeptídico que puede ser fácilmente identificado mediante un gel de poliacrilamida. Este sistema fue creado a partir de la búsqueda de pili y

adhesinas de bacterias Gram-positivas, que contienen frecuentemente uniones isopeptídicas espontáneas, comúnmente en dominios tipo inmunoglobulina CnaB1 o CnaB2 (Brune *et al.*, 2016). Todos los enlaces isopéptidicos bacterianos se encuentran en dominios de hojas  $\beta$  que se asemejan a la proteína Cna de *Staphylococcus aureus* (Symersky *et al.*, 1997; Deivanaygam *et al.*, 2000). Se sabe que los dominios CnaA y CnaB se producen en miles de proteínas de superficie bacteriana, y los enlaces isopéptidicos emergen como una modificación post traduccional muy común que sustenta la formación y estabilidad del pilus Gram-positivo. En las proteínas pilus bacterianas, la formación de un enlace isopéptidico depende de un residuo de Glu o Asp catalítico. Los enlaces isopéptidicos autogenerados entre las cadenas laterales de Lys y Asp han surgido como un sello distintivo de las proteínas de la superficie de las bacterias Gram-positivas después de su descubrimiento en la principal subunidad de pilina de *Streptococcus pyogenes* (Kang *et al.*, 2007).

*Streptococcus pyogenes* [grupo A *Streptococcus* (GAS)] infecta la garganta y la piel humanas, causando infecciones comunes como dolor de garganta y amigdalitis, así como enfermedades invasivas graves como fascitis necrotizante, fiebre reumática y síndrome de shock tóxico estreptocócico (Cunningham, 2000). Los pili delgados, de 2 nm de ancho y  $> 1 \mu\text{m}$  de largo, han sido revelados por microscopía electrónica y se demostró que eran esenciales para la adhesión a células de la piel y amígdala humana. Las proteínas formadoras de pilus se codifican en un pequeño grupo genético dentro de una isla de patogenicidad conocida como la región FCT (unión a la fibronectina, antígeno T de unión al colágeno). En la cepa *S. pyogenes* M1 SF370, *spy0128* codifica la subunidad pilin principal, *spy0129* la sortasa C1, y *spy0125* y *spy0130* a dos proteínas asociadas al pilin (Mora *et al.*, 2005). El monómero Spy0128 tiene una estructura alargada de dos dominios, (Fig. 6A). Ambos dominios tienen estructuras  $\beta$  irregulares, que son variantes modificadas del pliegue de inmunoglobulina (Fig. 6B). El dominio N-terminal o CnaB2 (residuos 18 a 171) forma un sándwich  $\beta$  en el que las hebras en una hoja  $\beta$  (verde en la Fig. 6) se extienden progresivamente de tal manera que la parte superior de esta hoja  $\beta$ , en la parte superior del dominio, está relativamente expuesta (Kang *et al.*, 2007). El

dominio C-terminal CnaB1 (residuos 173 a 307) comprende 11 hebras  $\beta$ . Los dos dominios se encuentran asociados por solo un residuo de serina (Ser172), separando el final de la cadena  $\beta$  del dominio N, del inicio del dominio C-terminal. El dominio CnaB2 es inusual, ya que ocurre aislado en secuencia y representa un dominio plegado independiente, ideal para abordar cuestiones relacionadas con el papel estructural de los enlaces isopeptídicos y el mecanismo de su formación (Hagan *et al.*, 2010).

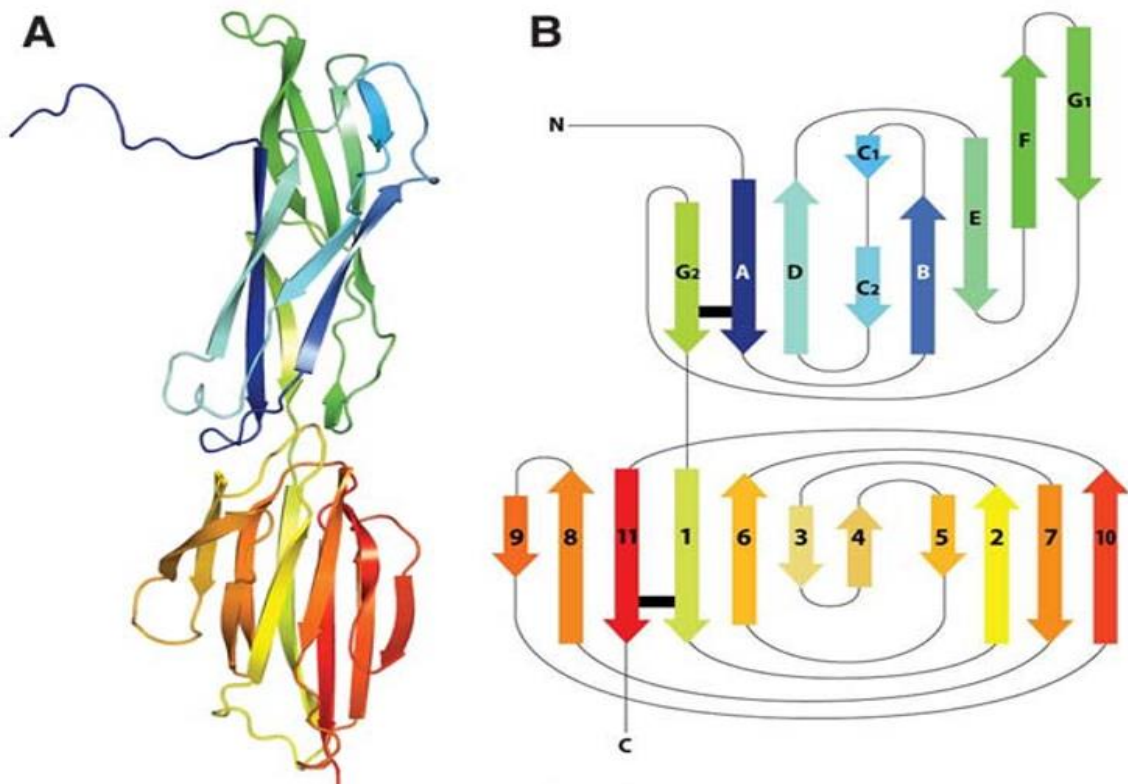


Figura 6. Estructura de spy0128. A: Representación de listón del monómero, código de colores del N-terminal (azul) al C-terminal (rojo). B: Diagrama de la topología del dominio N-terminal (arriba) y C-terminal (abajo). Las cadenas poseen el mismo código de color que en A. Las barras negras marcan la localización de las dos uniones isopeptídicas intramoleculares (PDB 3B2M) (Kang *et al.*, 2007).

Posteriormente Reddington y Howart (2012, 2015) determinaron que dividiendo la proteína del dominio CnaB2 (la cual es una proteína de unión a fibronectina FbaB de *Streptococcus pyogenes* (*Spy*)), se pueden obtener dos péptidos capaces de

reconstituirse espontáneamente para formar un enlace isopeptídico. Para lograr esta unión, es importante la acción de una triada catalítica (Asp, Glu y Lys), la cual debe estar presente entre el fragmento que se cortó y la subunidad restante. Los dos péptidos obtenidos a partir de la división del dominio CnaB2 fueron denominados SpyTag (13 residuos de aminoácido) y SpyCatcher (116 residuos de aminoácido). SpyTag/SpyCatcher reacciona a 10  $\mu\text{M}$  con un alto rendimiento con un tiempo medio de poco más de 1 minuto ( $k = 1.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). No poseen residuos de cisteína y pueden ser fusionados a los extremos N- o C- terminales y asas de una gran variedad de proteínas, sin afectar su funcionamiento (Fig. 7 A y B). Esta unión puede llevarse a cabo en un intervalo de temperaturas de 4 a 37  $^{\circ}\text{C}$ , valores de pH de 5 a 8, sin amortiguadores específicos, e incluso con detergentes no iónicos. La capacidad de formar este enlace isopeptídico espontáneo en una gran variedad de condiciones, y sin requerimientos restrictivos, ha permitido su uso en distintas aplicaciones biomédicas y biotecnológicas (Fig. 7C).

El mecanismo de reacción de CnaB2, ahora denominados SpyTag y SpyCatcher por la división de éste mediante ingeniería de proteínas, ocurre en un ambiente que es vital para la proteína, para llevar los residuos a una proximidad y orientación óptima. Antes de la reacción, se cree que los grupos carboxilos de Glu77 y Asp 117 forman un doble enlace de hidrógeno, facilitando el ataque nucleofílico del  $N_{\epsilon}$  de Lys31 al  $C_{\gamma}$  del Asp117, formando un intermediario zwitterionico. Después hay dos transferencias de protones concertadas, con el Glu77 formándose un intermediario tetraédrico neutral, el cual colapsa con la liberación de una molécula de agua. La molécula de agua se libera y se forma un enlace amida limitando la velocidad de reacción (Fig. 7D), con una barrera energética de 102 kJ/mol para el CnaB2 intacto (Hagan *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2011).

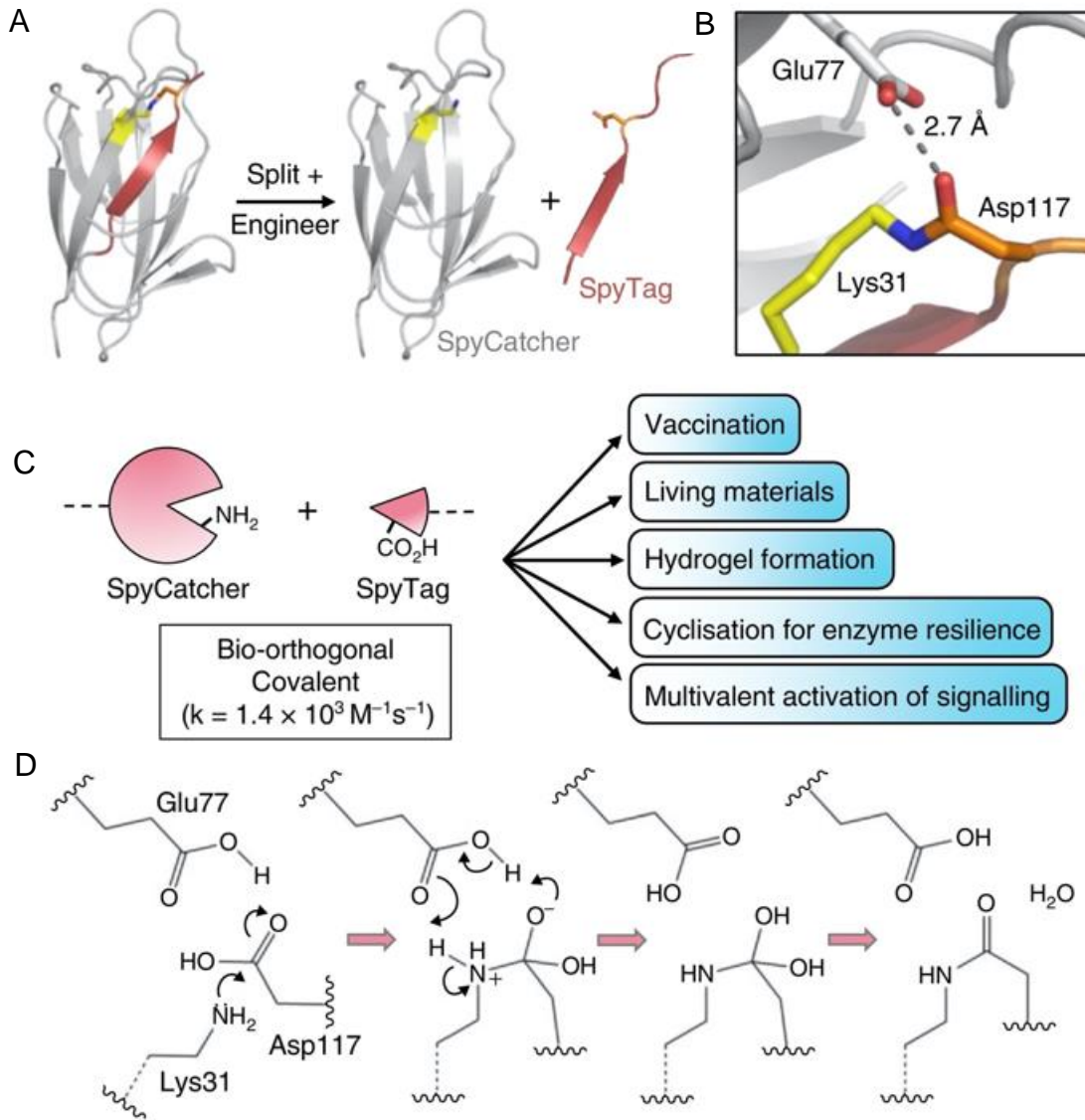


Figura 7. Sistema de interacción SpyTag/SpyCatcher. A: Estructura de CnaB2 dividida en SpyCatcher (gris) y SpyTag (rojo) B: Ambiente en el cual se lleva a cabo la unión entre Asp117 (naranja) y Lys31 (amarillo), facilitado por Glu77 (gris). C: Aplicaciones de SpyTag/SpyCatcher. D: Mecanismo de reacción. Lys31 ataca nucleofílicamente al Asp117, seguido por la transferencia de protones que involucran al Glu77, dirigiendo a un intermediario tetraédrico neutral y después la liberación de agua y la formación del enlace amida (Reddington & Howarth, 2015).

El entendimiento del mecanismo de unión de estos péptidos para la formación del denominado dominio CnaB2, abre nuevas oportunidades para mejorar la resiliencia a la agregación de enzimas mediante su ciclación, de esta manera una enzima mesofílica puede mejorar su tolerancia térmica evitando su desplegamiento a altas temperaturas o ayudar al replegamiento de la proteína de interés, permitiendo su uso en ambientes menos favorables. (Schoene *et al.*, 2014). Con este sistema se ha fomentado la activación del sistema inmune mediante la unión de antígenos, ya sea al SpyTag o al SpyCatcher, y su posterior unión a una molécula objetivo como una célula dendrítica, para generar una respuesta inmune eficiente en células B y T (Liu *et al.*, 2014). De igual manera, este sistema se puede utilizar para la creación de proteínas multifuncionales, fusionándolo a partículas polivalentes capaces de presentar el mismo péptido de manera milimétrica, o en su defecto para la formación de partículas con distintas funciones mediante SpyTag/SpyCatcher fusionados a distintos péptidos de interés (Fairhead *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2014).

En nuestro grupo de trabajo, hemos decorado VLPs de B19V mediante la fusión genética del péptido SpyTag al extremo N-terminal de la proteína VP2. Esto nos ha permitido decorar a estas partículas con enzimas activas y con reporteros fluorescentes (Cayetano-Cruz *et al.*, 2018). La amplia variedad de usos del sistema SpyTag/SpyCatcher nos podría permitir utilizarlo para titular los nuevos extremos N-terminales sobre la superficie de las VLPs formadas con la proteína VP2 permutada en el aminoácido 69, mediante la fusión del péptido SpyTag al extremo N-terminal de la proteína VP2-CP69 y su posterior interacción con el péptido SpyCatcher unido a un reportero fluorescente, la proteína *superfolder*-GFP (sfGFP) (Cayetano-Cruz *et al.*, 2019), quimera a la que denominamos SC-GFP. La cuantificación de la proteína SC-GFP unida a las VLPs compuestas por la proteína VP2-CP-69 que tiene al péptido SpyTag en su extremo N-terminal (ST-VP2-CP69) nos dejará establecer si en realidad los extremos N-terminales de esta proteína permutada se encuentran expuestos sobre la superficie de estas VLPs.



## **2. Hipótesis y Objetivos**

### **Hipótesis**

Mediante la fusión del péptido SpyTag al extremo N-terminal de la proteína VP2-CP69, se obtendrán proteínas quiméricas que podrán ensamblarse en VLPs y el extremo N-terminal fusionado con el SpyTag quedará expuesto en la superficie, por lo tanto, será capaz de interactuar con la proteína SpyCatcher unida a una proteína reportera.

### **Objetivo general**

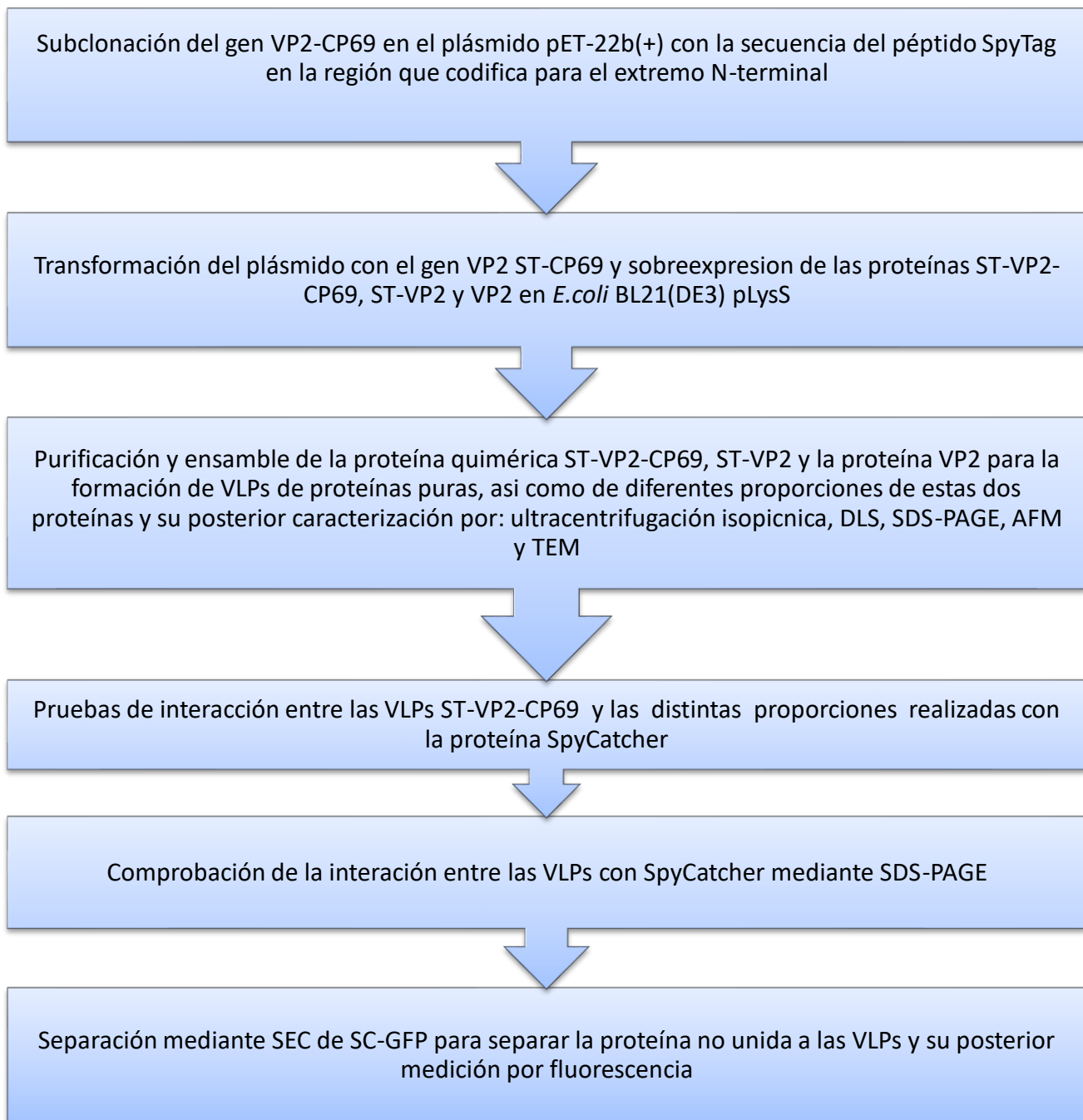
Comprobar la exposición de los extremos N-terminal de VP2-CP69 al ensamblarse en VLPs mediante titulación por el sistema SpyTag/SpyCatcher.

### **Objetivos particulares**

- Fusionar la secuencia nucleotídica que codifica para el péptido SpyTag al extremo 5' del gen que codifica para la proteína VP2-CP69 mediante subclonación.
- Expresar en *E. coli* el gen de la quimera formada (ST-VP2 -CP69), y purificar la proteína quimérica.
- Realizar el ensamble de las proteínas quiméricas para la obtención de VLPs
- Comprobar la presencia del péptido SpyTag en la superficie de las VLPs a través de la titulación de su interacción con la proteína SpyCatcher unida a un reportero fluorescente.

### 3. Metodología

#### Esquema general de trabajo



## Métodos

### Subclonación

El gen de la proteína VP2 permutada circularmente en el residuo 69 (CP69) se encontraba clonado en el vector pET22b(+) (pETCP69), entre los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI*, y además codifica para un espaciador (GGSGGSGGSGG) en su extremo N-terminal que incluye un sitio de restricción *BamHI*. Con el fin de fusionar VP2-CP69 al péptido SpyTag en el extremo N-terminal, se realizó una subclonación del gen de la proteína VP2-CP69 presente en el vector pETCP69, a un plásmido derivado del pET22b(+) que ya contaba con la secuencia que codifica para el péptido SpyTag (pETST-VP2) unido al de la proteína VP2 y separados por el mismo espaciador que también tenía un sitio de restricción para *BamHI*, cabe destacar que anteriormente, en nuestro grupo de trabajo se agregó la secuencia que codifica para el péptido SpyTag al extremo 5' del gen de la proteína VP2 mediante PCR (Cayetano-Cruz et al., 2018). Ambos plásmidos, se cortaron con las enzimas de restricción *XhoI* y *BamHI* para generar los mismos extremos cohesivos en el inserto con el gen VP2-CP69 y en el vector de interés con la secuencia de SpyTag para su posterior ligación. Posteriormente se purificó el vector (derivado de pETST-VP2) y el inserto de interés (derivado de pETCP69) mediante el kit de purificación de DNA a partir de gel de agarosa (Jena Bioscience), de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Una vez obtenidos los fragmentos, se llevó a cabo la reacción de ligación con ligasa de T4 (New England Biolabs) de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

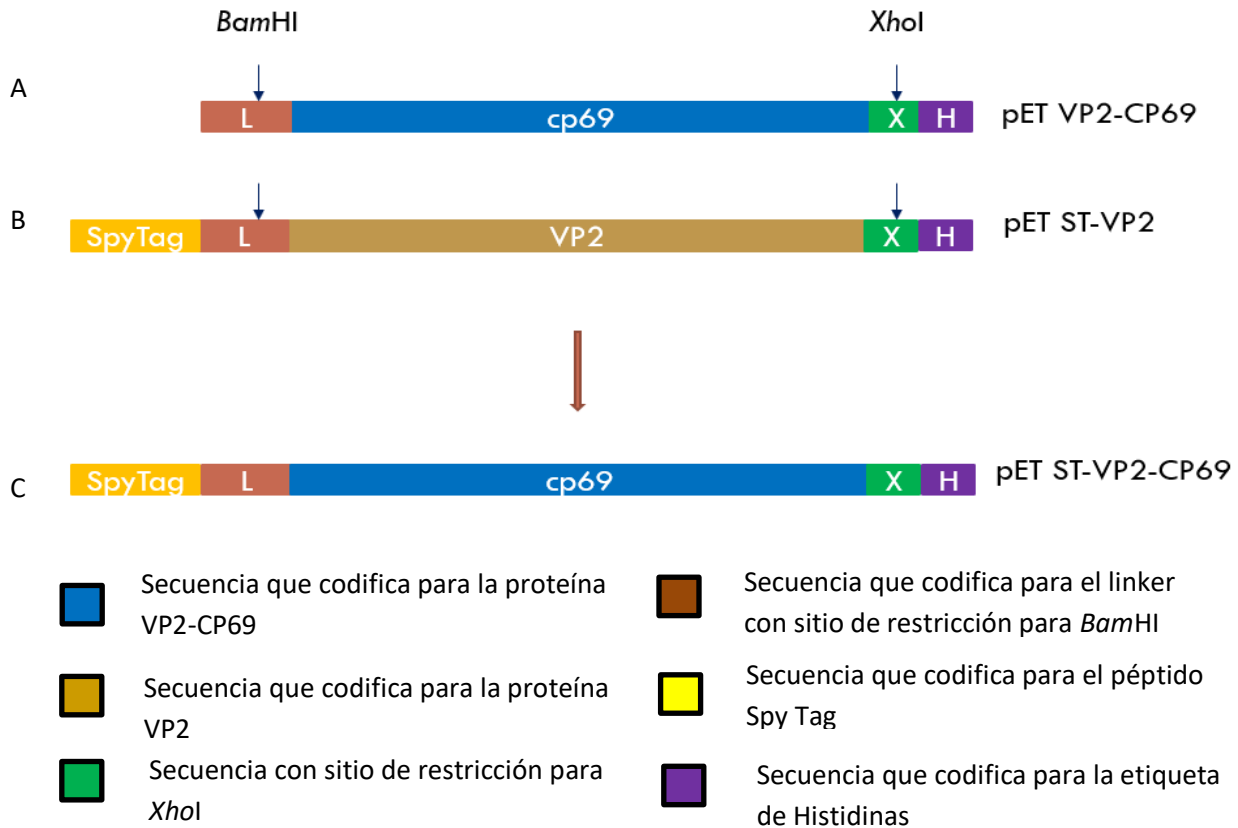


Figura 8. Representación del proceso de ligación, para la obtención de la secuencia que codifica a la proteína ST-VP2-CP69 en el vector de expresión pET22b(+). A: Esquema de la secuencia de la proteína VP2 con la permutación circular en el aminoácido 69 clonada en el sitio de clonación múltiple del pET22b(+). B: Esquema de la secuencia de la proteína VP2 con la secuencia del péptido SpyTag en el extremo 5' clonada en el sitio de clonación múltiple del pET22b(+). C: Producto de la ligación, con el esquema de la secuencia de la proteína ST-VP2-CP69.

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

El producto de la ligación de VP2-CP69 fusionado al extremo amino N-terminal con la secuencia del péptido SpyTag (ST-VP2-CP69) se usó para transformar células de *E. coli* DH5 $\alpha$  quimiocompetentes preparadas de acuerdo con el método descrito por Inoue (Inoue *et al.*, 1990). Estas células suelen dar mejores resultados para la transformación y se obtiene una mayor cantidad de DNA plasmídico con un grado

de pureza más alto comparado con células de *E. coli* BL21(DE3). Por lo que se siguió el siguiente protocolo de transformación:

### **Protocolo de transformación de células quimiocompetentes**

1. Se tomó un tubo con 50  $\mu$ L de células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ , almacenadas a -70°C y se colocaron en hielo. En condiciones de esterilidad se les agregaron 10  $\mu$ L del vector ligado y se incubaron en hielo por 30 min.
2. Las células se pusieron a incubar inmediatamente, en un termobloque previamente calentado a 42°C, por 60 s para generar el choque térmico.
3. Después de esta segunda incubación se volvió a poner en hielo el tubo por 2 min y nuevamente en condiciones de esterilidad se le agregaron 250  $\mu$ L de medio LB.
4. Una vez mezclado el medio con las células se procedió a incubar el tubo a 37°C por 1 h con agitación orbital a 250 r.p.m.
5. Después de esta etapa de recuperación se procedió a inocular las células en placas de medio LB con ampicilina (100  $\mu$ g/mL), para lo cual se pusieron 25  $\mu$ L del medio con células en cada caja y se lo distribuyó mediante perlas de vidrio estériles para favorecer la obtención de colonias aisladas.
6. Las cajas se colocaron en la incubadora y se dejaron creciendo por 16 h a 37°C. Una vez que pasó el tiempo de incubación se observaron las cajas que presentaron colonias y se las colocó en el cuarto frío a 4°C para retrasar su crecimiento.

Al tener las células de *E. coli* DH5 $\alpha$  ya transformadas con el plásmido pETST-VP2-CP69 se procedió a purificar el DNA plasmídico para corroborar su presencia mediante un gel de agarosa y proceder con la transformación de este en células de *E. coli* BL21(DE3) pLysS, mediante el siguiente protocolo:

### **Protocolo de purificación de DNA plasmídico (fenol/cloroformo)**

1. De las cajas obtenidas, se seleccionaron varias colonias aisladas las cuales se inocularon en tubos de 10 mL con medio LB con ampicilina (100 µg/mL) hasta que alcanzaron una densidad óptica de 0.6 a 600 nm. En este punto se tomaron 3 mL del cultivo para preparar tubos con glicerol al 30% (concentración final) para su almacenamiento a -70°C.
2. Del mismo cultivo se tomó 1 mL y se centrifugó en un tubo eppendorf de 1.5 mL a 9000 r.p.m. durante 1 min, se descartó el sobrenadante y sobre este mismo tubo se adicionó 1 mL del cultivo y se volvió a centrifugar (Este paso se repitió una vez más).
3. Al pellet obtenido se le resuspendió en 100 µL de una solución para lisis celular, compuesta por 50 mM de glucosa, 25 mM de Tris-HCL pH 8, 10 mM de EDTA y 5 mg/mL de lisozima. Ya mezclado, se incubó a 37°C durante 30 min.
4. Después se le adicionaron 200 µL de una solución recién preparada de NaOH 0.2 M y SDS al 4%. Se agitó suavemente para homogenizar la solución y se incubó en hielo durante 10 min.
5. Posteriormente se le agregaron 150 µL de una solución 5 M de acetato de potasio (pH 5) y nuevamente se incubó por 10 min.
6. Para separar el DNA plasmídico de los restos celulares, se centrifugó la muestra a 14000 r.p.m. durante 5 min a temperatura ambiente. Al final se transfirieron 400 µL del sobrenadante a un tubo nuevo.
7. A este sobrenadante se le agregaron 200 µL de fenol saturado de amortiguador y se mezcló invirtiendo el tubo suavemente, de igual forma se le agregaron 200 µL de cloroformo y se mezcló suavemente. Para separar el DNA plasmídico de proteínas y otros restos celulares se volvió a centrifugar como en el paso 6.
8. Una vez que terminó la centrifugación se formaron dos fases, la superior, que es acuosa, es la que contiene el DNA plasmídico. De ésta, se tomó el mayor volumen posible tratando de no mezclarla con la otra fase.

9. Para poder precipitar el DNA plasmídico de esta fase, se mezcló con un volumen igual de isopropanol en un tubo nuevo y se incubó a temperatura ambiente por 3 h.
10. Posteriormente se recolectó el DNA plasmídico mediante centrifugación (14000 r.p.m. durante 15 min) a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y al pellet obtenido se lavó con etanol al 80%; este paso se repitió 2 veces. Por último, el DNA se secó al vacío en el equipo de liofilización Speed Vac.
11. Finalmente, se resuspendió el DNA plasmídico en 25  $\mu$ L de amortiguador TE estéril con RNAsa para eliminar RNA copurificado. Se incubó por 1 h a 37°C antes de guardarlo.

Con el DNA plasmídico ya purificado se procedió a realizar una prueba de digestión para comprobar que nuestro vector realmente contenía el inserto de interés, nuevamente se utilizaron las enzimas *XhoI* y *BamHI* y se incubaron a 37°C por 1 h, el producto obtenido se sometió a electroforesis en un gel de agarosa (1%) y se analizó en un transiluminador UV T1203 tras teñirlo con bromuro de etidio. Una vez que se comprobó cuáles fueron los plásmidos que liberaron el inserto, se eligió uno para realizar la transformación de las células quimiocompetentes de *E. coli* BL21(DE3) pLysS. Para esto se siguió el protocolo de transformación mencionado anteriormente.

### **Sobreexpresión de las proteínas**

Las condiciones de sobreexpresión de la proteína VP2, ya se habían reportado anteriormente (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012), por lo tanto, la sobreexpresión de la proteína recombinante ST-VP2-CP69 se realizó el mismo protocolo:

### **Protocolo de sobreexpresión**

1. Se preparó un primer inóculo en 10 mL de medio LB con ampicilina (100  $\mu$ g/mL) a partir de una colonia aislada de *E. coli* BL21(DE3) pLysS, la cual fue previamente secuenciada para verificar la secuencia del gen. El tubo con

medio de cultivo se incubó a 37°C, con agitación orbital de 220 r.p.m. durante 12 h.

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

### **Obtención de las proteínas ST- VP2-CP69, ST-VP2 y VP2 en cuerpos de inclusión**

Anteriormente se ha descrito que las proteínas basadas en la proteína VP2 expresadas en *E. coli* tienden a formar cuerpos de inclusión durante la etapa de sobreexpresión, y la proteína ST-VP2-CP69 no fue la excepción. Para la limpieza de cuerpos de inclusión se utilizó el siguiente protocolo (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012; Santillán-Urbe *et al.*, 2015; Cayetano-Cruz *et al.*, 2018).



## **Protocolo de limpieza y solubilización de las proteínas**

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

## **Purificación de las proteínas VP2, ST-VP2-CP69 y ST-VP2**

Las proteínas quiméricas utilizadas están provistas de una etiqueta de Histidinas en el extremo C-terminal para facilitar su purificación por cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC por sus siglas en inglés), por tal motivo se utilizó una matriz Protino Ni-TED que permitió la interacción de la proteína con los iones de níquel presentes en la matriz, para lo cual se utilizó el protocolo siguiente:

## Protocolo de purificación

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

Posteriormente se realizó la cuantificación de la proteína por espectrofotometría a una longitud de onda de 280 nm. Empleando como referencia una curva de calibración obtenida a partir de disoluciones de albúmina sérica bovina (BSA) solubilizada en la solución amortiguadora R. Todos los puntos de la curva fueron preparados por triplicado, con un volumen final de 1000  $\mu$ L y concentraciones desde 100  $\mu$ g/mL hasta 1 mg/mL.

### **Purificación de la proteína SC-GFP**

La proteína SC-GFP posee la siguiente secuencia de aminoácidos:

MRKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATNGKLTCLKFICTTGKLPV  
PWPTLVTTLTLYGVQCFAFYRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGTYKTR  
AEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNFSHNHVVITADKQKNGIKANFK  
IRHNVEDGSLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHVLSLQSVLSKDPNEKRDHMLV  
LEFVTAAGITHGMDELYKGGSGGSGGSGGMSYYHHHHHHHDYDIPTTENLYFQG  
AMVDTLTSLGSLSEQQSGDMTIEEDSATHIKFSKRDEEDGKELAGATMELRDSSGK  
TISTWISDGGQVKDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQQQVTVNGKAT  
KGDAHILEHHHHHHH\*

El plásmido que contiene al gen que codifica para la proteína verde fluorescente unida al SpyCatcher (Cayetano-Cruz et al., 2019) se transformó en la cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS a 37 °C y 200 rpm en medio Luria Bertani, con 100  $\mu$ g/mL de ampicilina para seleccionar las clonas transformadas con el vector. El cultivo se escaló a un volumen final de 500 mL, se utilizó el mismo protocolo para la sobreexpresión de la proteína quimérica ST-VP2-CP69, disminuyendo el tiempo de incubación a 8 h a 30°C. Se centrifugaron las células a 5000 rpm durante 10 min y se resuspendió el sedimento celular en Amortiguador A para cargar la columna (0.5 M NaCl, 20 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM Imidazol, pH 7.4). Posteriormente se sonicó en cama de hielo con pulsos de 20 s y pausas de 40 s durante 15 min y se centrifugaron a 15000 rpm por 15 min a 4°C para recuperar la proteína ubicada en el sobrenadante. Se verificó la sobreexpresión de la proteína por SDS-PAGE.

Ya que la proteína ST-VP2-CP69 contiene una etiqueta de Histidinas en el extremo C-terminal, se purifica mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC por sus siglas en inglés). Por tal motivo se utilizó una matriz Protino Ni-TED que permitió la interacción de la proteína con los iones de Ni<sup>2+</sup> presentes en la matriz. Posteriormente se utilizó una columna de cromatografía de intercambio aniónico Hi-Trap, con el fin de disminuir la cantidad de proteínas no deseadas y solo obtener a la proteína de interés. En consecuencia, se siguió el siguiente protocolo de purificación:

1. El sobrenadante recuperado se cargó a una columna de afinidad HisTrap HP (5 mL) acoplada a un sistema FPLC y equilibrada previamente con Amortiguador A (NaCl 0.5 M, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, Imidazol 20 mM, pH=7.4).
2. La columna se lavó con 8 volúmenes de columna del amortiguador A, después la proteína se eluyó con Amortiguador B (NaCl 0.5 M, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, Imidazol 0.5 M, pH=7.4).
3. Se analizaron las fracciones mediante SDS-PAGE.
4. Debido a las múltiples impurezas obtenidas al concentrar la proteína, se realizó una segunda etapa de purificación utilizando la columna HiTrap Q (HP). Se usó el amortiguador A sin NaCl para cargar la columna y el amortiguador de elución B sin Imidazol, para despegar la proteína mediante un gradiente de este mismo compuesto.
5. Las fracciones ubicadas bajo el pico del cromatograma fueron colectadas y analizadas por SDS-PAGE para verificar la pureza. Después se cuantificó la concentración de proteína mediante ensayo de BCA.
6. La proteína se almacenó con un amortiguador de fosfatos pH= 7.4 a una proporción 1:1 con glicerol estéril para filtrarse por 0.45 µm y conservarse a -20 °C.

### **Ensamble y caracterización de VLPs mediante DLS**

El ensamble de las partículas tipo virus se realizó a partir de las proteínas ST-VP2-CP69, ST-VP2 y VP2, llevando a cabo ensambles con cada una de las proteínas puras y a partir de estas proteínas en 2 distintas proporciones 20%(ST-VP2-CP69)-

80%(VP2) y 50%(ST-VP2-CP69)-50%(VP2) (Fig. 9). El ensamble se realizó en el amortiguador de Ensamble (amortiguador R), para esto se llevó a la proteína a una concentración de 0.6 mg/mL en un volumen final de 1.5 mL. Posteriormente fue dializada frente a un amortiguador PBS 2x L-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 L-Arg, pH 7.4), para eliminar el agente desnaturante (Gdn-HCl). La muestra se dejó en diálisis durante un periodo total de 42 h a una temperatura de 4°C, con agitación. Para caracterizar los ensambles obtenidos y comprobar que realmente se hayan formado especies de un tamaño similar a las VLPs, las muestras fueron analizadas por dispersión dinámica de luz (DLS por sus siglas en inglés) en un equipo Zetasizer μV (Malvern Instruments). La dispersión dinámica de luz es una técnica basada en los principios del movimiento browniano y el efecto Doppler, mediante los cuales se determina el tamaño y la masa de las partículas que se encuentran en suspensión. Los parámetros para el análisis fueron fijados en 1.33 para el índice de refracción, 1.003 cp para la viscosidad, y 25°C para la temperatura. Se utilizó una celda de vidrio con capacidad de 500 μL. Antes de analizar las muestras en el DLS se pasaron por cartuchos de filtración con un tamaño de poro de 0.45 μm y después por cartuchos de filtración con un tamaño de poro de 0.22 μm. Todas las muestras tratadas por Cromatografía de Exclusión Molecular (SEC, por sus siglas en inglés) ya no fueron filtradas por los cartuchos mencionados anteriormente. Cada muestra fue analizada mediante cinco ciclos, cada ciclo constituido de 10 determinaciones con un intervalo de 10 segundos entre cada medición.

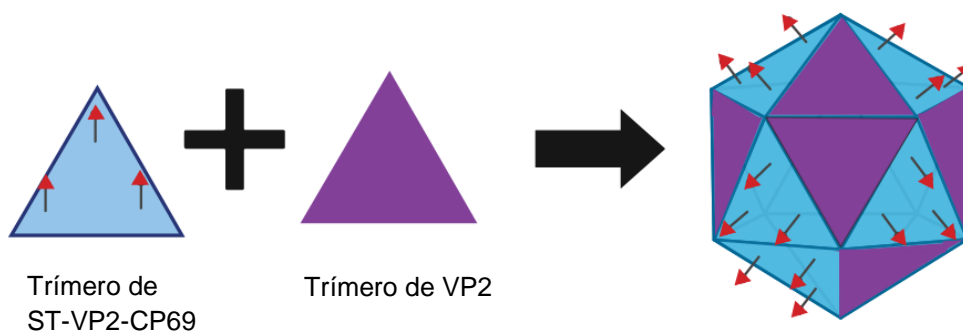


Figura 9. Esquema de la posible formación de VLPs a partir de distintas proporciones de las proteínas ST-VP2-CP69 y VP2 (Los trímeros podrían ser mixtos, es decir, contener VP2 y ST-VP2-CP69). Las líneas unidas a los triángulos rojos representan a los extremos N-terminales de la proteína ST-VP2-CP69.

### **Caracterización de VLPs mediante ultracentrifugación isopícnica**

Para corroborar que las VLPs formadas contuvieran a las proteínas VP2, ST-VP2-CP69, y las mezclas de ellas en las proporciones empleadas (20:80 y 50:50), se realizó su caracterización mediante ultracentrifugación isopícnica, la cual es una técnica que permite separar moléculas y/o partículas con base en la densidad que éstas poseen al encontrarse en un gradiente de densidad continuo. El equilibrio entre la fuerza centrífuga y la fuerza de difusión provocan que los analitos se concentren en la región del gradiente donde su densidad es igual a la densidad de la solución que los rodea. Así, no se producirá sedimentación debido a que las partículas flotarán sobre el material que posea mayor densidad que ellas, de tal suerte que, aunque se prolongue el tiempo de centrifugación, las partículas no irán al fondo. A la densidad en este punto se conoce como “bouyant density” (densidad flotante) (Hull, 2014). Durante el proceso *in vitro* que se emplea para la obtención de VLPs a partir de proteínas quiméricas, existen fenómenos asociados a las características intrínsecas de estas proteínas que favorecen la agregación de la proteína y de las VLPs recién formadas. Esta técnica permite constatar la formación de VLPs, ya que gracias a ella es posible distinguir y separar a las VLPs de las especies intermediarias y de los agregados de proteína. Los gradientes continuos se formaron a partir de una solución de CsCl con densidad de 1.33 mg/mL. Para preparar esta solución se utilizaron 40.8 g de CsCl que fueron solubilizados en 79.22 mL de la solución amortiguadora de gradiente  $A_{gra}$  (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>, 10 mM EDTA, 0.5% v/v de Tritón X-100, pH 7.4). En cada tubo para centrífuga, con capacidad para contener 5 mL de solución (Ultra-Clear Beckman 11 x 60 mm), se colocaron 3.5 mL de la solución amortiguadora  $A_{gra}$ , y posteriormente 500 µL de la solución que contiene a las VLPs. El proceso

de ultracentrifugación se llevó a cabo empleando un rotor del tipo 60 Ti en un equipo Optima™ XL-100K Class S, ambos de la marca Beckman. Las condiciones del proceso se fijaron en 55,000 r.p.m. a una temperatura de 20°C y durante un periodo de tiempo de 10 H con 45 min. Las bandas generadas por efecto de la formación del gradiente fueron recuperadas y sometidas a un proceso de diálisis para su posterior caracterización por SDS-PAGE.

### **Purificación de VLPs mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC)**

Las proteínas obtenidas a partir de ensamblajes de proteínas puras, así como de diferentes proporciones de VP2 y ST-VP2-CP69, ya caracterizadas mediante DLS (esto con el fin de asegurar que estas ensamblaran correctamente), se purificaron mediante un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución de la marca Waters, con una columna para purificación mediante SEC, para la obtención de las VLPs aisladas de sus intermediarios. La columna que se utilizó fue empacada con la fase estacionaria denominada Sephacryl S500 HR. Se utilizó la solución amortiguadora PBSArg (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) como fase móvil. El flujo de la etapa preparativa se mantuvo en 0.5 mL/min y se utilizó un detector UV-Vis ajustado a una longitud de onda de 280 nm para dar seguimiento al progreso de la purificación. A partir del minuto 50 se inició la colección de las muestras, en fracciones de 2.0 mL cada una. Posteriormente cada una de estas fracciones fue analizada por DLS para detectar la presencia de VLPs y confirmar el aislamiento de estas.

### **Análisis de VLPs y de estructuras supramoleculares por Microscopía de Fuerza Atómica**

La microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés) es una poderosa herramienta que permite caracterizar materiales con dimensiones en la escala nanométrica. Las muestras que fueron analizadas por esta técnica se filtraron empleando unidades de la marca Millipore con tamaño de poro de 0.22 µm. Se colocaron 30 µL de la solución remanente 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. Con el propósito de eliminar los cristales formados por la presencia de sales en las soluciones amortiguadoras empleadas durante el proceso de ensamble, se realizaron dos ciclos subsecuentes de limpieza con agua desionizada que previamente fue filtrada con cartuchos de 0.22  $\mu\text{m}$ . Finalmente, las muestras fueron llevadas nuevamente a sequedad en condiciones de presión reducida y a una temperatura de 25°C y 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 HiRes-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 táctil.

### **Caracterización de VLPs por Microscopia Electrónica de Transmisión**

Para el análisis por TEM se utilizó un microscopio de transmisión Tecnai 12 de Phillips, que se encuentra en el Instituto Nacional de Rehabilitación ubicado en la ciudad de México, para lo cual se efectúa una tinción negativa con ácido fosfotúngstico al 3% pH=7. Se analizaron las muestras de la proteína quimérica (ST-VP2-CP69) de la muestra ya purificada por HPLC, de esta se tomaron 10  $\mu\text{L}$  que fueron colocados sobre una rejilla de cobre recubierta de formvar durante 5 min. Una vez transcurrido el tiempo, se quitó el exceso de volumen y se dejó fijar durante un min. Posteriormente se adicionaron 5  $\mu\text{L}$  del medio de contraste (ácido fosfotúngstico al 3% pH=7) y se dejó durante un min. Se eliminó el exceso de volumen y se dejó secar a temperatura ambiente durante una h.



### Interacción de la proteína ST-VP2-CP69 con el péptido SpyCatcher (SC)

Se utilizaron las VLPs purificadas por SEC (asegurando la interacción exclusivamente de VLPs y no de intermediarios o agregados), tanto de partículas formadas por proteínas puras de VP2 (control negativo) y ST-VP2-CP69, así como de las VLPs constituidas de diferentes proporciones de estas 2 proteínas (80:20 y 50:50 de VP2 y ST-VP2-CP69 respectivamente), la interacción entre las VLPs antes mencionadas con SC-GFP (proteína superfolder GFP unida al dominio SpyCatcher) se realizó en un amortiguador de PBS con 0.2 M L-Arg, pH 7.4, incubado en un Termomixer (Eppendorf) a 25°C, 400 r.p.m. durante 4 h (Fig. 10), en una proporción de cada proteína 1:2 (Cayetano *et al.* 2018). Posteriormente se realizó un SDS-PAGE de la muestra para visualizar la interacción de la proteína ST-VP2-CP69 con el SC-GFP.

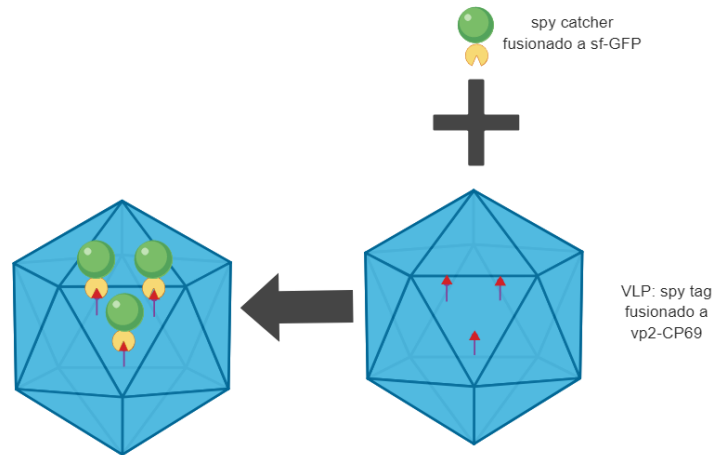


Figura 10. Representación de la interacción entre la proteína SC-GFP con las VLPs formadas con VP2 y ST-VP2-CP69.

### **Cinética de interacción entre la proteína quimérica ST-VP2-CP69 y SC-GFP**

Se utilizaron VLPs con una proporción 50:50 de la proteína ST-VP2-CP69 y VP2, para analizar la interacción entre el péptido SpyTag fusionado a la proteína quimérica y el SpyCatcher unido a la proteína sf-GFP. Se usó una proporción molar de dos veces SC-GFP por una de ST-VP2-CP69, para seguir la interacción a lo largo del tiempo (0, 15, 30, 60, 120, 180, 240 y 300 min) y su visualización a través de SDS-PAGE.

### **Purificación por SEC de VLPs fusionadas a SC-GFP**

Una vez obtenida la conjugación entre el par SpyCatcher/SpyTag de las VLPs con el SpyTag y la proteína GFP con el SpyCatcher (realizada a una proporción molar 1:1), se utilizó una columna de cromatografía de exclusión molecular (SEC) para separar los intermediarios de partículas que no ensamblaron, agregados, y separar las proteínas que si reaccionaron de las que no. El producto de la reacción fue microfiltrado a través de una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  y cargada en una columna Superdex 200 prep grade, previamente equilibrada con PBS adicionado con 0.2 M L-Arg, pH 7.4. La separación de la proteína fue monitoreada a 280 nm, las fracciones colectadas (2 mL) se analizaron por DLS.

### **Fluorescencia de VLPs quiméricas**

La fluorescencia de las partículas fue realizada a 20°C. El espectro de emisión de fluorescencia fue registrado de 495 a 540 nm, usando una longitud de onda de excitación de 485 nm y con ranuras de excitación y de emisión de 0.5 mm. Se realizó una curva de calibración con distintas concentraciones de la proteína SC-GFP (5-80  $\mu\text{g}$ ) a partir de la intensidad de fluorescencia obtenida a 514 nm. Para calcular la concentración de SC-GFP acoplada a las VLPs formadas a partir de las proteínas ST-VP2-CP69, ST-VP2, y la proporción 1:1 (VP2/ ST-VP2-CP69); todas las proteínas fueron llevadas a la misma concentración de VLPs (15.8  $\mu\text{g}$ ). Posteriormente se prosiguió con la medición de las partículas por fluorescencia, con 3 repeticiones por muestra, finalmente la señal de fluorescencia, a una longitud de

onda de emisión de 514 nm, se interpolaron en la curva de calibración, calculando la concentración de SC-GFP acoplada a las distintas VLPs.

## 4. Resultados y Discusión

### Subclonación

Después de los procesos de corte y ligación del gen de interés y el vector con el gen que contiene la secuencia que codifica para el SpyTag se obtuvieron varias colonias que fueron usadas para purificar plásmido. Los plásmidos fueron digeridos con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I para liberar el inserto sin la secuencia del péptido SpyTag y con *Nde*I y *Xho*I para liberar el inserto con la secuencia del péptido SpyTag. Con el fin de demostrar que el fragmento esperado se encontraba en el nuevo plásmido, el cual se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%. El resultado del gel muestra bandas con los pesos esperados, tanto del vector (~5400 pb) como del inserto ST-VP2-CP69 (~1700 pb). Los dos insertos liberados, con y sin la secuencia del péptido SpyTag, se observan en el gel en un peso aproximado de ~1700 pb debido a que la diferencia en las pares de bases agregadas por la secuencia de SpyTag es mínima (Fig. 11). El plásmido se envió a secuenciar para comprobar que en el proceso de ligación no hubo problemas que pudieran comprometer la secuencia del gen quimérico resultante (Fig. 12).

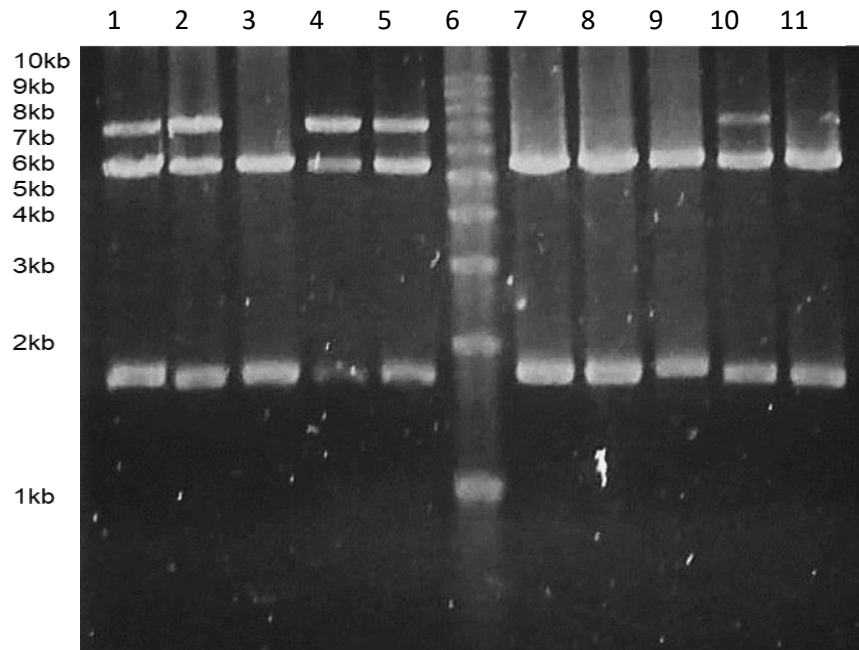


Figura 11. Gel de agarosa mostrando los productos de la digestión del plásmido de las colonias analizadas con el inserto ST-VP2-CP69. Carriles 1, 2, 3, 4 y 5: Digestión del plásmido pET ST-VP2-CP69 con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I de las colonias a, b, c, d y e. Carril 6: Marcador de peso molecular. Carriles 7, 8, 9, 10 y 11: Digestión del plásmido pET ST-VP2-CP69 con las enzimas de restricción *Nde*I y *Xho*I de las colonias a, b, c, d y e.

MAHIVMVDAYKPTKGGSGSGSGGKEAKVCTISPIMGYSTPWRYLDFNALNLFFSPLEFQ  
 HLIENYGSIAPDATVTI SEIAVKDVTDKTGGGVQVTDSTTGRLCMLVDHEYKYPYVLGQGQ  
 DTLAPELPIWVYFPPQYAYLTVGDVNQGISGDSKKLASEESA FYVLEHSSFQLLGTGGTAT  
 MSYKFPPVPPENLEGCSQH FYEMYNPLYGSRLGVPDTLGGDPKFRSLTHEDHAIQPQNFMP  
 GPLVNSVSTKEGDSSTGAGKALTGLSTGTSQNTTRISLRPGPVSQPYHHWDTDKYVTGINA  
 ISHGQTTYGNAEDKEYQQGVGRFPNEKEQLKRLQGLNMHTYFPNKGTQQYTDQIERPLMVG  
 SVWNRRALHYESQLWSKIPNLDDSFKTQFAALGGWGLHQPPPQIFLKILPQSGPIGGIKSM  
 GITTLVQYAVGIMTVTMTFKLGLRKATGRWNPQPGVYPPHAAGHLPYVLYDPTATDAKQHH  
 RHGFEKPEELWTA KSRVHPLEGGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSMWSEGATFSANSV  
 TCTFSRQFLIPYDPEHHYKVFSPAASSCHNASGLEHHHHH\*

Figura 12. Secuencia de aminoácidos de la proteína quimérica ST-VP2-CP69. Los aminoácidos marcados en amarillo corresponden al péptido SpyTag. Los residuos de aminoácidos marcados en turquesa son los residuos de aminoácidos en el nuevo extremo N-terminal. Los residuos de aminoácidos marcados en gris indican la secuencia de la proteína VP2. Los residuos de aminoácidos marcados en morado corresponden al puente que une los antiguos extremos N- y C-terminales. Los residuos de aminoácidos marcados en verde corresponden a la etiqueta de histidinas.

### **Sobreexpresión de la proteína ST-VP2, ST-VP2-CP69 y VP2**

Al determinar que el plásmido ligado se encontraba presente, se procedió a realizar la transformación de éste en células de *E. coli* BL21(DE3) pLysS. Todas las proteínas utilizadas en este trabajo se transformaron en estas células para posteriormente continuar con la sobreexpresión, la cual se llevó a cabo mediante la adición de IPTG al cultivo en una concentración final de 0.25 mM al llegar a la mitad de su fase logarítmica. Se comprobó la inducción, mediante SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 12%, de todas las proteínas utilizadas. Se estimó un peso molecular aproximado de la proteína ST-VP2 de 59 kDa, concordando con el peso molecular esperado para esta proteína (Cayetano *et al.*, 2018). Al comprobar la sobreexpresión en el gel de agarosa de las proteínas VP2 y ST-VP2-CP69 se observó un aumento en su peso molecular respecto a VP2 con ~58 kDa y ~60 kDa para ST-VP2-CP69 (Fig. 13), debido a la adición del péptido SpyTag en el extremo amino terminal.

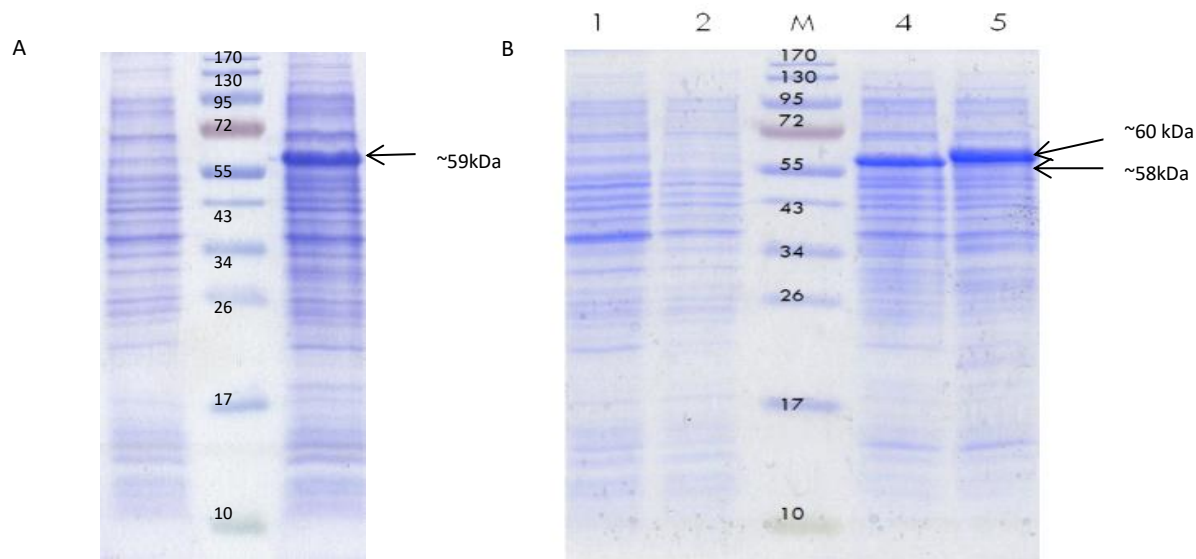


Figura. 13. SDS-PAGE de la sobreexpresión de las proteínas ST-VP2, VP2 y ST-VP2-CP69. A: Sobreexpresión de la proteína ST-VP2. Carril 1: células sin inducir. Carril M: marcador de peso molecular. Carril 2: células inducidas. B: Sobreexpresión de las proteínas VP2 y ST-VP2-CP69. Carril 1: células de VP2 sin inducción. Carril 2: células de ST-VP2-CP69 sin inducción. Carril M: marcador de peso molecular. Carril 4: células de VP2 inducidas. Carril 5: células de ST-VP2-CP69 inducidas.

### Purificación de las proteínas ST-VP2-CP69, ST-VP2 y VP2

Una vez que se determinó que la proteína quimérica es capaz de sobreexpresarse en células de *E. coli* BL21(DE3) pLysS, se continuó con el protocolo de purificación de la proteína. La proteína ST-VP2-CP69 se expresa en forma de cuerpos de inclusión, al igual que VP2, ST-VP2 y la gran mayoría de sus quimeras conocidas, como se ha reportado previamente (Bustos-Jaimes *et al.*, 2017; Sánchez-Rodríguez *et al.* 2012; Santillán *et al.*, 2015). Partiendo de los cuerpos de inclusión solubilizados, se realizó la purificación de las proteínas VP2, ST-VP2-CP69 y ST-VP2 por IMAC y se analizaron las fracciones obtenidas mediante SDS-PAGE (Fig. 14). Las fracciones con una mayor cantidad de proteína y con menos proteínas adicionales no deseadas se mezclaron y concentraron mediante un Amicon Ultra-

15 (50 kDa) para filtración con centrifuga. Posteriormente se cuantificó la proteína por espectrofotometría a una longitud de onda de 280 nm de acuerdo con la metodología previamente descrita. Se obtuvo una concentración para VP2 de 4 mg/mL, de ST-VP2-CP69 1.5 mg/mL y de ST-VP2 1.7 mg/mL. Cada proteína se llevó a una concentración de 0.6 mg/mL en 1.5 mL de amortiguador R para su ensamble, al dializarla frente a un amortiguador PBS L-Arg.

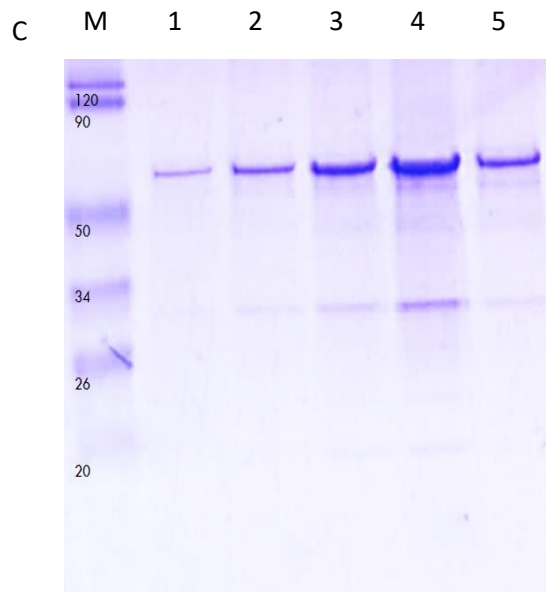
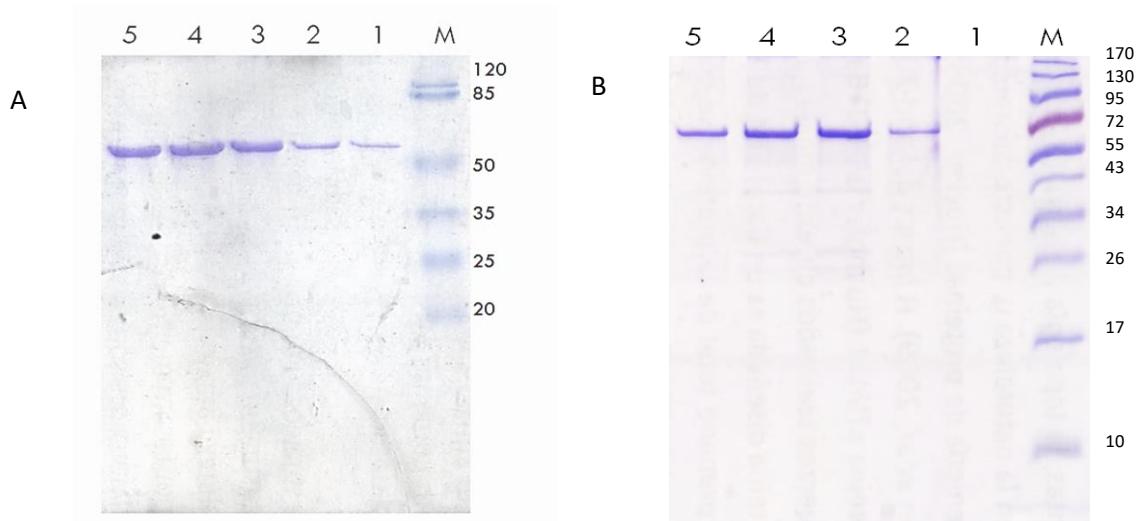


Figura 14. SDS-PAGE de la purificación de las proteínas VP2, ST-VP2-CP69 y ST-VP2. A: Fracciones de la proteína VP2, carril M: marcador de peso molecular. Carriles 1, 2, 3, 4 y 5: Fracciones obtenidas en la elución. B: Fracciones de la proteína ST-VP2-CP69, carril M: marcador de peso molecular. Carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7: Fracciones obtenidas en el amortiguador de elución. C: Fracciones de la proteína ST-VP2, carril M: marcador de peso molecular. Carriles 1, 2, 3, 4 y 5: Fracciones obtenidas en la elución.

### **Sobreexpresión de la proteína SC-GFP**

Se realizó la transformación del plásmido con el gen que codifica a la proteína SC-GFP (pETSC-GFP) en células de *E. coli* BL21(DE3) pLysS, para posteriormente llevar a cabo la sobreexpresión mediante la adición de IPTG al cultivo en una concentración 0.25 mM al llegar a la mitad de su fase logarítmica de crecimiento. Al analizar por SDS-PAGE los perfiles de proteínas intracelulares se observó una banda en el peso molecular esperado de ~43 kDa en la fracción soluble, característica que ya se ha reportado previamente para esta quimera de la proteína sfGFP (Cayetano-Cruz *et al.*, 2019) (Fig. 15).



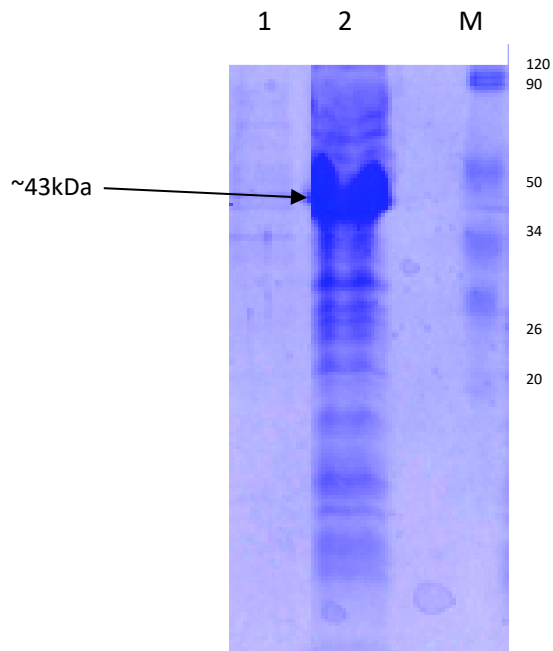


Figura 15. SDS-PAGE de la sobreexpresión de la proteína SC-GFP. Carril 1: células antes de la inducción. Carril 2: células después de la inducción. Carril M: Marcador de peso molecular.

### **Purificación de la proteína SC-GFP**

Al comprobarse la sobreexpresión de la proteína SC-GFP en células de *E. coli* BL21(DE3) pLysS se continuó con la purificación de esta, a partir de la fracción soluble mediante IMAC, para posteriormente analizar las fracciones obtenidas por un SDS-PAGE (Fig. 16). Las fracciones con una mayor cantidad de proteína y con menos proteínas contaminantes se mezclaron y concentraron mediante un Amicon Ultra-15 (50 kDa) para filtración con centrifuga.

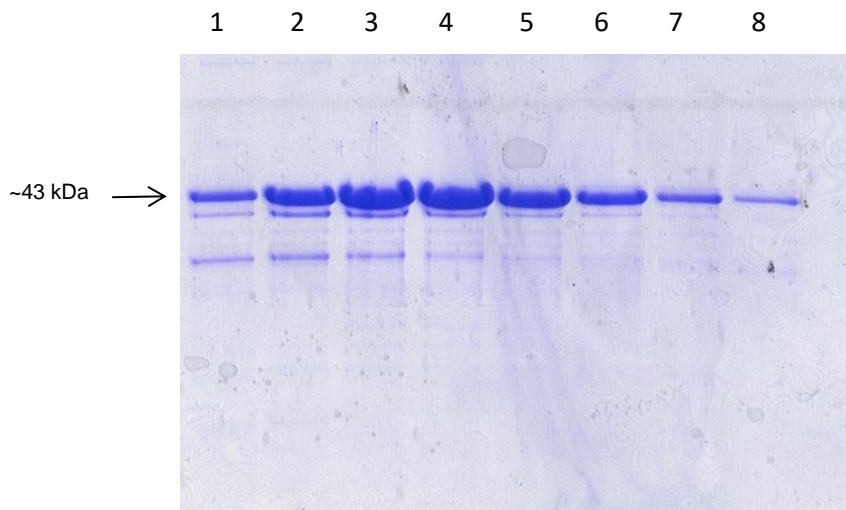


Figura 16. SDS-PAGE de la purificación de la proteína SC-GFP por IMAC. Carriles 1-8: fracciones obtenidas durante la elución.

Al analizar el gel obtenido a partir de la purificación por IMAC, se observó que a pesar de obtener mayoritariamente la proteína de interés, no se han eliminado una parte considerable de proteínas no deseadas, por lo que se realizó un segundo paso de purificación mediante una columna de cromatografía de intercambio aniónico (Hi Trap Q) con el fin de disminuir la cantidad de proteínas no deseadas. Las fracciones obtenidas se analizaron en un SDS-PAGE (Fig. 17) y aquellas con una mayor cantidad de la proteína de interés se concentraron mediante un Amicon Ultra-15 (50 kDa) por centrifugación.

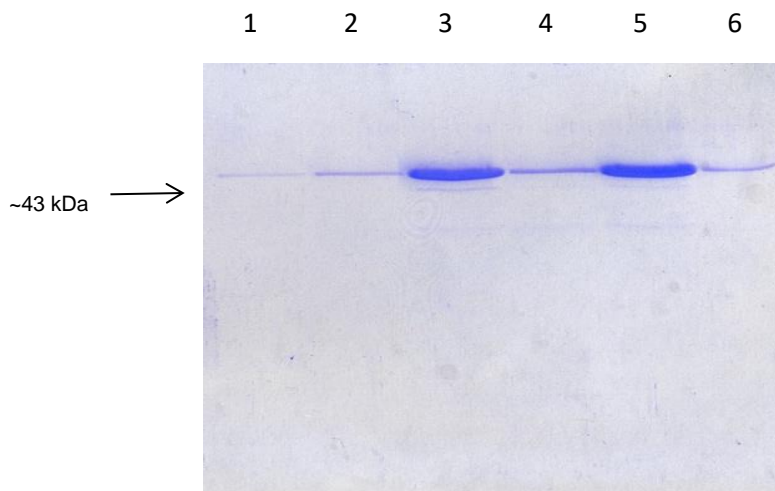
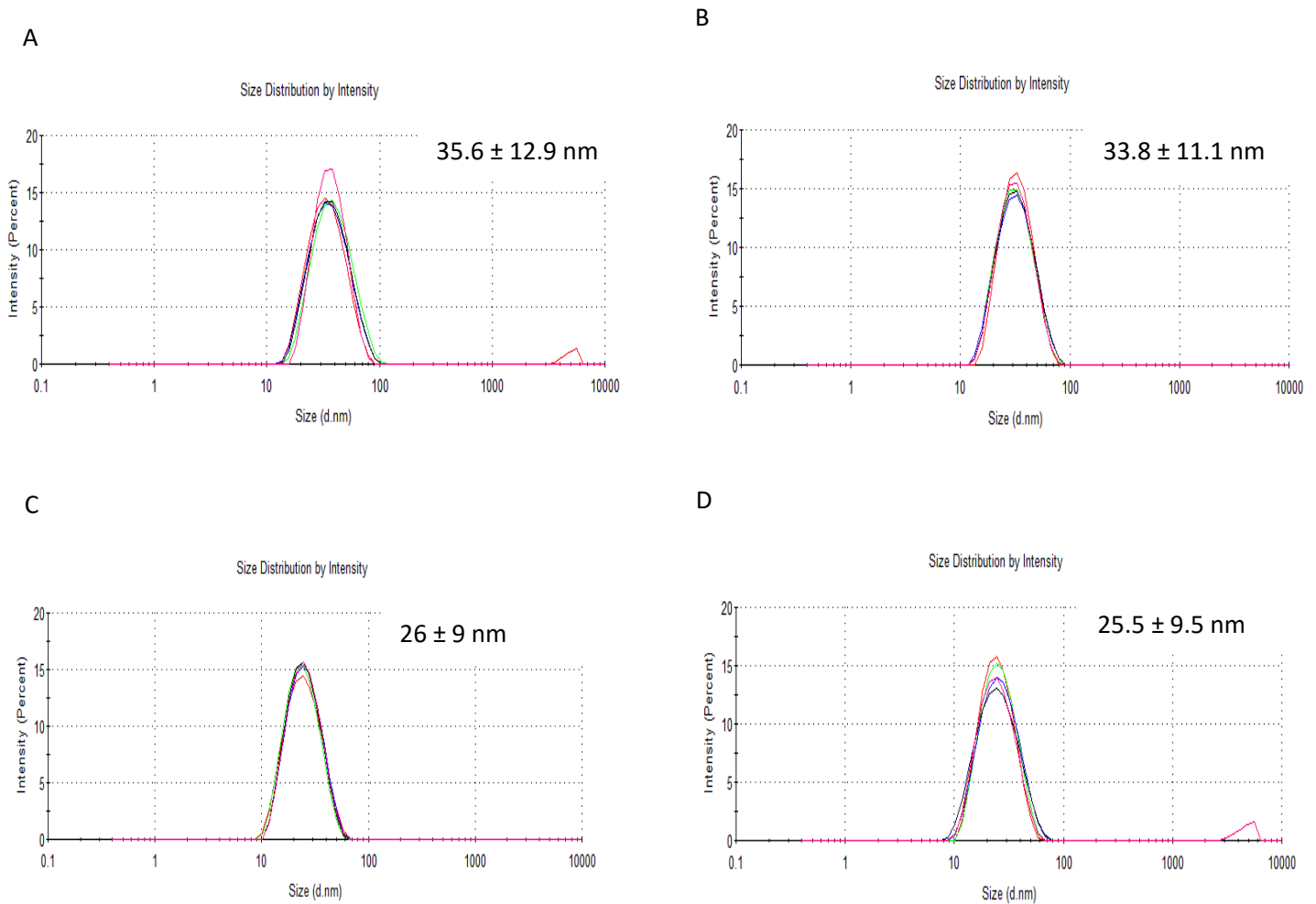


Figura 17. SDS-PAGE de la purificación de la proteína SC-GFP por cromatografía de intercambio iónico (Hi Trap Q). Carriles 1-6: fracciones obtenidas en la elución.

### **Ensamble de VLPs y caracterización por DLS**

Las VLPs se ensamblaron por diálisis al equilibrio para eliminar el agente caotrópico. Posteriormente, las partículas fueron purificadas por SEC y se realizó la caracterización de las VLPs formadas por VP2 o ST-VP2-CP69, así como las partículas formadas por mezclas de estas proteínas en distintas proporciones (80:20 y 50:50), mediante DLS. Se encontró que las partículas de VP2 presentaban un diámetro de partícula de  $25.5 \pm 9.5$  nm, muy cercano a los valores antes reportados para las partículas de VP2 (18-24 nm) (Cayetano-Cruz *et al.*, 2018, 2019; Bustos-Jaimes *et al.*, 2017; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012; Santillán-Uribe *et al.*, 2015). Las VLPs con una proporción 20% de ST-VP2-CP69 y 80% de VP2 tuvieron un diámetro de partícula de 26 nm, muy cercano a las VLPs formadas únicamente por VP2, resultado que era de esperarse ya que la mayoría de la partícula está formada principalmente por VP2. Las VLPs formadas por la proteína ST-VP2-CP69 únicamente presentaron un aumento en su diámetro con respecto a las VLPs formadas por VP2 o la proporción 20:80, esto puede deberse a que la exposición de los extremos amino terminal en su superficie junto con el péptido SpyTag aumentan el diámetro aparente de la misma. Este resultado concuerda con lo reportado por Coffen en el 2018, donde menciona que las partículas formadas por la proteína quimérica VP2 con el SpyTag en el amino terminal posee un aumento en el diámetro de la partícula comparada con las partículas de VP2 silvestre. En ese trabajo se argumenta que el aumento en el número de extremos N-terminales externalizados aumenta el tamaño aparente de las VLPs. En consecuencia, en las VLPs de ST-VP2-CP69, el aumento del diámetro hidrodinámico de las VLPs (35 nm), indica que posiblemente todos o la mayoría de los extremos N-terminal se encuentran externalizados. De igual manera, las VLPs con una proporción 50:50 de las dos proteínas mencionadas, tuvieron un diámetro de 33 nm, similar a lo mencionado para las VLPs de ST-VP2-CP69. Por lo tanto, es importante destacar

que el diámetro en el pico máximo de cada VLP formada de distintas proteínas fue aumentando conforme se elevó la proporción de la proteína ST-VP2-CP69, sugiriendo que probablemente esta proteína mantenga su extremo N-terminal en la superficie y en consecuencia provoque un aumento en el diámetro determinado por DLS. Con respecto a las VLPs formadas por la proteína ST-VP2, se observó un tamaño similar al de las partículas formadas por la proporción 20:80. Esto se puede deber a que solo una fracción de sus extremos amino terminales está externalizada, por lo tanto, su tamaño, aumenta gradualmente de acuerdo con la exposición de sus extremos N- terminales (Fig. 18).



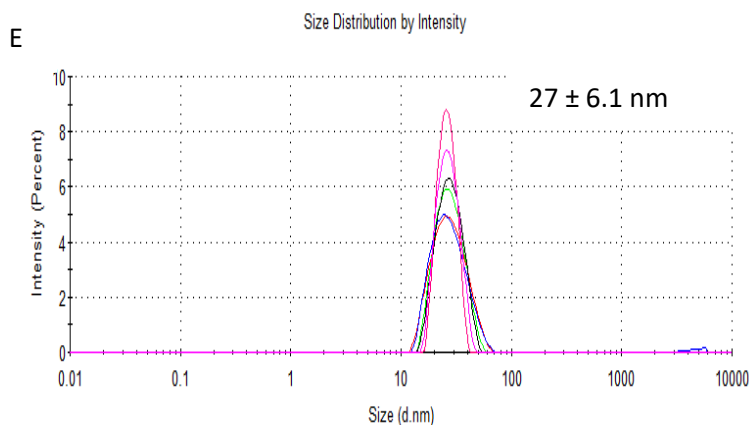


Figura 18. Análisis por DLS de las VLPs obtenidas a partir de las distintas proporciones de las proteínas VP2 y ST-VP2-CP69 y de proteínas puras de las proteínas mencionadas. A: ST-VP2-CP69. B: 50:50 (VP2 y ST-VP2-CP69) C: 80:20 (VP2 y ST-VP2-CP69, respectivamente). D: VP2. E: ST-VP2.

### Caracterización de VLPs mediante ultracentrifugación isopícnica

Posteriormente, se realizó la caracterización de las partículas mediante ultracentrifugación isopícnica, obteniendo las dos bandas esperadas tanto para los intermediarios como para las VLPs (Fig. 19). Se determinaron densidades mayores para las proteínas integradas con una mayor cantidad de ST-VP2-CP69 (Tabla 1). Los valores de densidad previamente reportados por nuestro grupo para VP2 (1.28 g/ml), y las densidades obtenidas para VLPs formadas a partir de VP2 y la proporción 20:80 fueron cercanas a las ya reportadas (Sánchez-Rodríguez *et al.* 2012, 2014). Estas partículas, además de contar con una proteína de peso molecular mayor, deberían de tener una mayor masa de proteína en su interior debido a la presencia del puente que conecta los antiguos segmentos N- y C-terminales, confiriéndoles así una mayor densidad. Las bandas que corresponden a las VLPs fueron recuperadas y analizadas mediante SDS-PAGE (Fig. 20) y se constató que las partículas estaban constituidas por las proteínas quiméricas empleadas durante el proceso de ensamblaje.

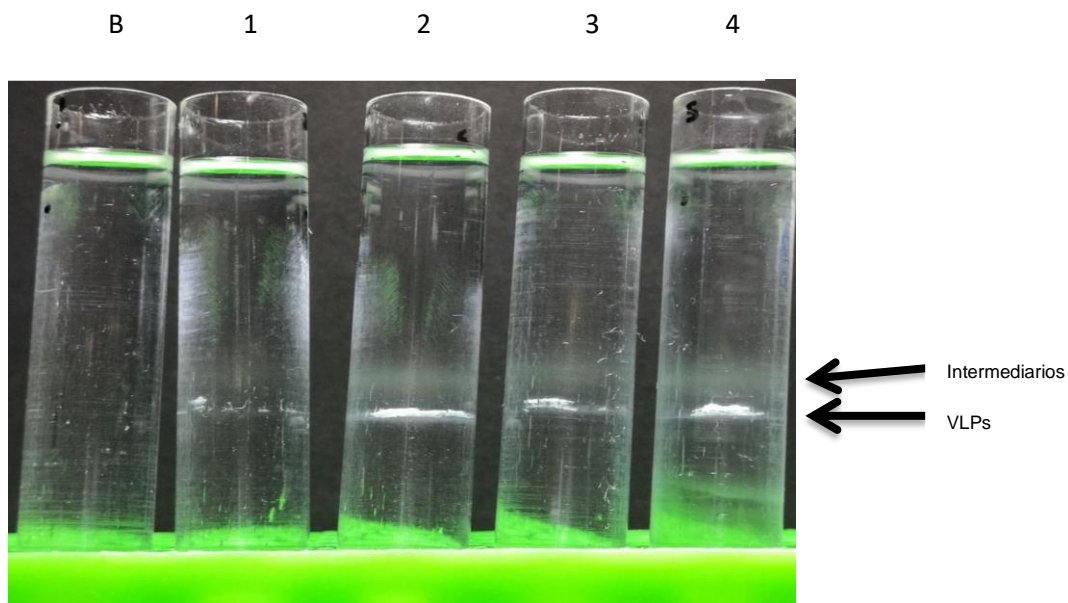


Figura 19. Análisis por centrifugación isopícnica en gradiente de CsCl. Carril B: Blanco. Carril 1: VP2. Carril 2: ST-VP2-CP69. Carril 3: Coensamble VP2:ST-VP2-CP69 (80:20). Carril 4: Coensamble VP2:ST-VP2-CP69 (50:50).

Tabla 1. Valores de la densidad obtenida a partir de las distintas VLPs.

VLPs	Densidad (g/mL)
VP2	1.26
VP2-ST-CP69	1.29
VP2:VP2-ST-CP69 80:20	1.27
VP2:VP2-ST-CP69 50:50	1.30

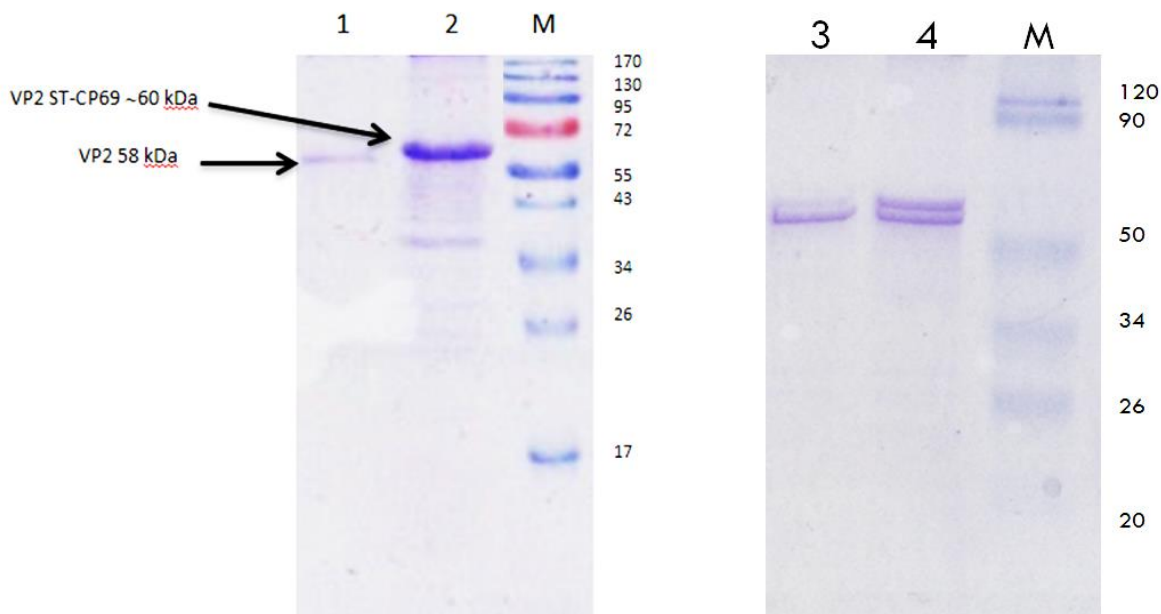


Figura 20. SDS-PAGE de las VLPs tomadas a partir de la centrifugación isopícnic. Carril 1: VP2. Carril 2: ST-VP2-CP69. Carril 3: VP2:ST-VP2-CP69 80:20. Carril 4: VP2:ST-VP2-CP69 50:50. Carril M: Marcador de peso molecular.

### Purificación de VLPs por SEC

El pico principal de las especies formadas por la proteína ST-VP2-CP69 presentó un tiempo de retención mayor (76 min) en la columna de exclusión molecular Shephacryl S-500, que el correspondiente a la proteína VP2 (74 min). Esto implica que el tamaño de las especies predominantes en el ensamble de ST-VP2-CP69 son ligeramente mayores que aquellas formadas por la proteína VP2. Esto coincide con la hipótesis de la exposición de los extremos N-terminales con el péptido SpyTag en la superficie de las partículas formadas por ST-VP2-CP69. En contraste, VP2, al no externalizar la mayoría de sus extremos N-terminales y no contar con el péptido SpyTag fusionado a esta región, tendría un tamaño de partícula menor. Como era de esperarse, las especies formadas por la proteína ST-VP2 tuvieron un tiempo intermedio (75 min) entre los tiempos de retención de las dos proteínas anteriores.

Las VLPs formadas por ST-VP2 llegan a externalizar la mayoría de sus extremos N- terminales, sin embargo, no todos quedan expuestos por el eje de orden 5 (Cayetano-Cruz *et al.*, 2018). Por lo tanto, el tiempo de retención es menor que el de las VLPs de VP2, pero mayor al de las VLPs de la proteína con la permutación circular. Con respecto a las VLPs formadas por una proporción 50:50 de las proteínas VP2 y ST-VP2-CP69, se observa un tiempo de retención similar (74.5 min) al de las VLPs formadas por ST-VP2. Es posible suponer que esto se debe la misma causa, ya que poseen una mayor cantidad de extremos N-terminales en su superficie que VP2, pero menor que las partículas de ST-VP2-CP69 (Fig. 21).

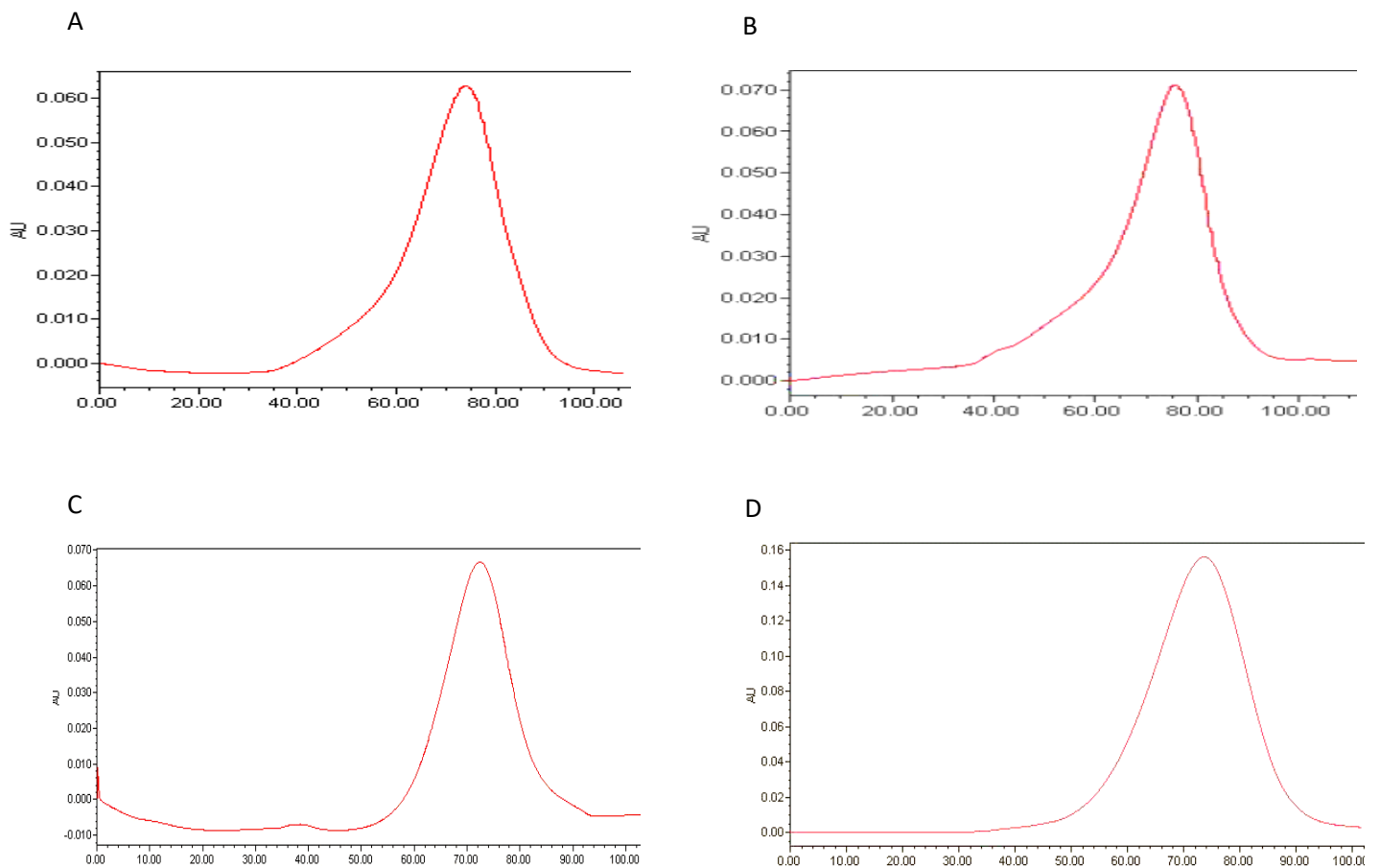


Figura 21. Cromatogramas obtenidos mediante cromatografía de exclusión molecular. A: ST-VP2-CP69. B: VP2. C: ST-VP2. D: 50-50 (ST-VP2-CP69 y VP2).



### **Caracterización de VLPs por Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)**

Se caracterizaron las VLPs formadas a partir de la proteína ST-CP69 mediante AFM y se observaron partículas de distintos diámetros desde los 20 nm hasta los 40 nm. Sin embargo, predominaron las que poseen diámetros en el intervalo de 30-35 nm (Fig. 22), concordando con los diámetros obtenidos por DLS.

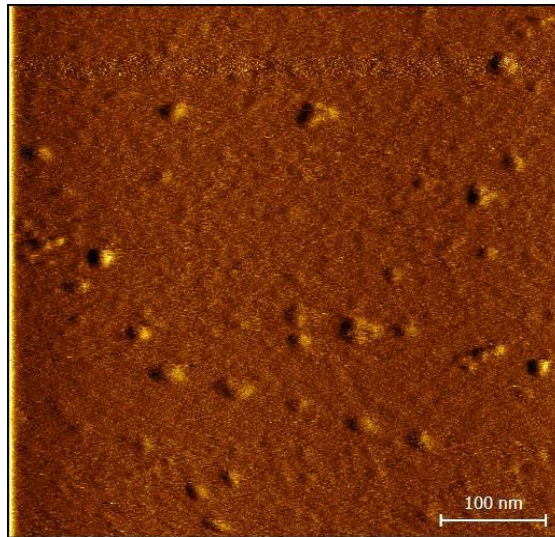


Figura 22. Micrografía obtenida por microscopía de fuerza atómica de VLPs de la proteína ST-VP2-CP69.

### **Caracterización de VLPs por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)**

Se analizaron las micrografías obtenidas por TEM de VLPs formadas a partir de ST-CP69 y se observaron partículas con diámetros cercanos a los obtenidos por AFM, entre 30 y 35 nm de diámetro, el tamaño esperado para estas partículas (Fig. 23).

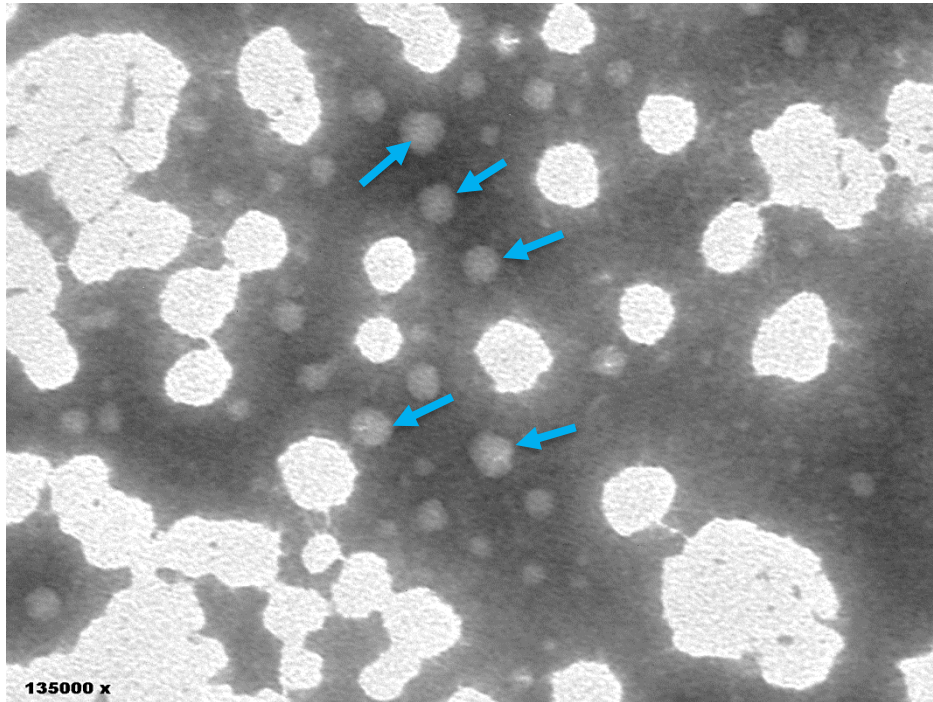


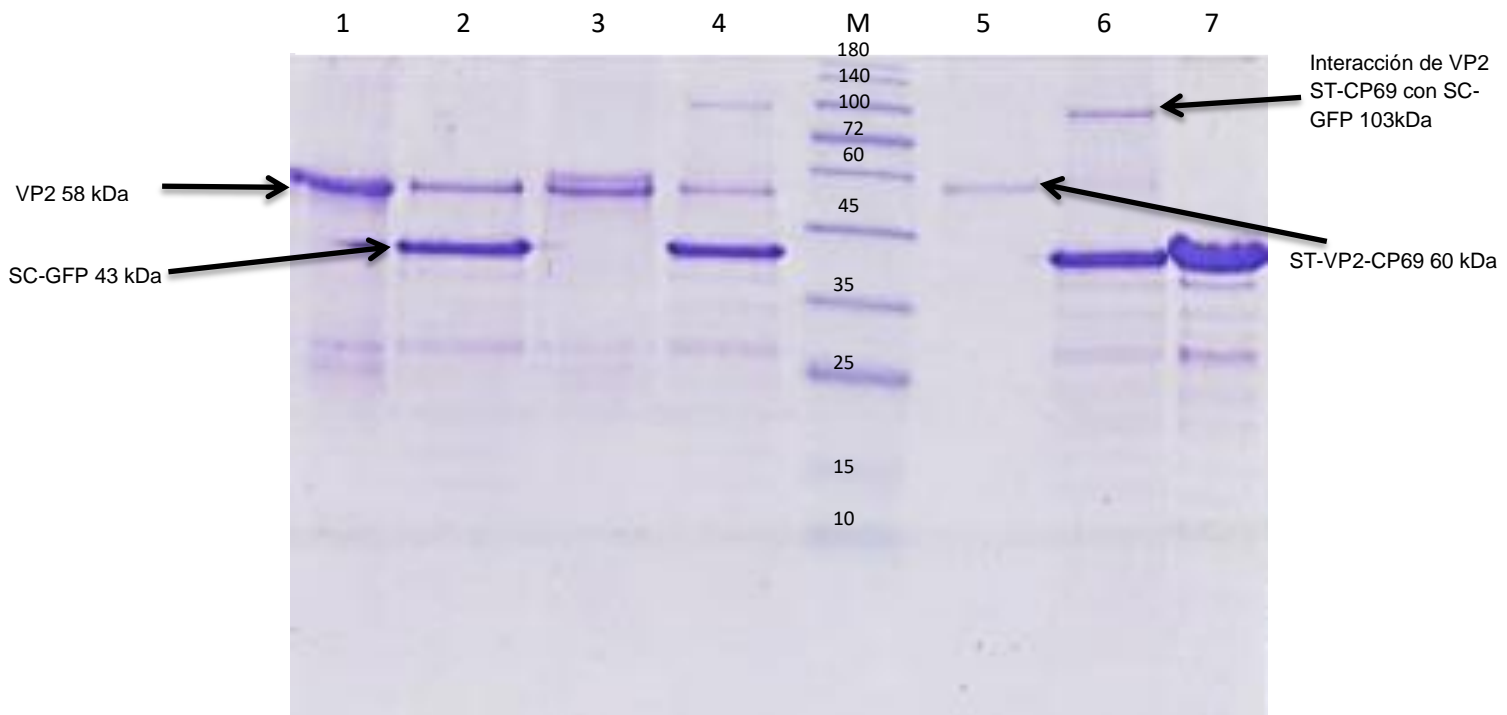
Figura 23. Micrografía obtenida por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las especies formadas por la proteína ST-VP2-CP69.

### **Interacción de la proteína ST-VP2-CP69 con el péptido SpyCatcher (SC)**

Una vez obtenidos los ensamblados de la proteína quimérica VP2-ST-CP69 y VP2, así como los purificados por SEC en la proporción 50:50, se procedió a realizar la interacción de las mismas con la proteína SC-GFP (proteína superfolder GFP unida al dominio SpyCatcher) de acuerdo con las condiciones mencionadas anteriormente. A continuación, se analizaron las muestras mediante SDS-PAGE, en donde se observó claramente la interacción entre las proteínas ST-VP2-CP69 (~60 kDa) y SC-GFP (~43 kDa) a través de la aparición de especies de mayor peso molecular (~103 kDa), (Fig. 24) Además, se observó que las VLPs formadas únicamente de la proteína ST-VP2-CP69 interactúan de manera más eficaz que las VLPs con distintas proporciones de ST-VP2-CP69 y VP2, ya que la banda observada de la interacción es más intensa. Sin embargo, se sigue manteniendo

una banda tenue de la proteína ST-VP2-CP69 restante. Esto permite especular que posiblemente no todos los extremos N-terminales se encuentran externalizados o que, debido a un impedimento estérico, no hubo oportunidad de que todos los extremos N-terminales, a pesar de encontrarse externalizados, interaccionaran con la proteína SC-GFP. Con respecto a la interacción dada con las VLPs de la proporción 50:50, se observa que la banda de la proteína ST-VP2-CP69 desaparece completamente. Esto sugiere que la falta de interacción de esta proteína en VLPs de proteína pura ST-VP2-CP69 se debe a un impedimento estérico, ya que al reducir la proporción de esta proteína en la VLP se llega a observar el consumo total de esta proteína (ST-VP2-CP69). Cabe mencionar que se trabajó anteriormente con VLPs en una proporción 20:80 de las proteínas ST-VP2-CP69 y VP2 respectivamente, sin embargo, al determinar que con la proporción 50:50 desaparecía por completo la banda de la proteína con la permutación circular, ya no fue necesario seguir trabajando con VLPs de la proporción 20:80 debido a que se cumplió el objetivo deseado (Fig. 24A). Con respecto a la interacción con las VLPs de la proteína ST-VP2 se observó mediante el SDS-PAGE que la proteína interaccionó con la proteína SC-GFP formando una banda con un peso molecular de ~102 kDa. Sin embargo, no interaccionaron todos los extremos N-terminales posibles debido a que se observó una banda remanente de la proteína sin reaccionar, lo que concuerda a lo ya reportado por Cayetano y colaboradores en el 2018, donde mencionan que las VLPs de esta proteína externaliza sus extremos N-terminales en aproximadamente un 70% de los casos, por lo que se observa en el gel una pequeña cantidad de proteína sin interaccionar (Fig. 24B), comparado con las VLPs de la proteína ST-VP2-CP69, posee aparentemente una mayor eficiencia de interacción debido a que la cantidad de proteína sin interaccionar es menor que la observada en la interacción por VLPs de ST-VP2.

A



B

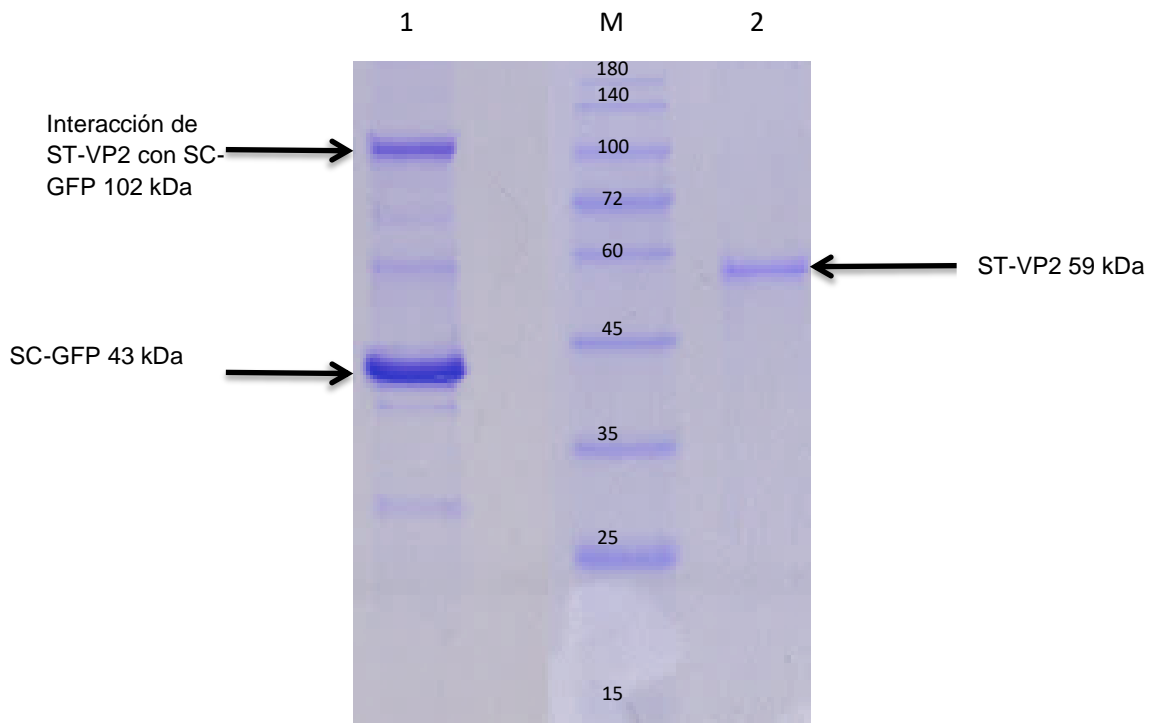


Figura 24. SDS-PAGE de la interacción de VLPs con SC-GFP. A: Interacción de VLPs de las proteínas VP2, 50-50 y ST-VP2-CP69 con SC-GFP. 1: VP2. 2: VP2 con un exceso de SC-GFP. 3: VLPs 50:50. 4: Interacción de VLPs 50:50 con un exceso de SC-GFP. 5: VLPs de ST-VP2-CP69. 6: Interacción de VLPs ST-VP2-CP69 con un exceso de SC-GFP. 7: SC-GFP. M: Marcador de peso molecular. B: Interacción de VLPs de la proteína VP2 ST-NH con SC-GFP. 1: ST-VP2 con un exceso de SC-GFP. 2: ST-VP2.

### **Cinética de interacción entre la proteína quimérica ST-VP2-CP69 y SC-GFP**

Con el fin de determinar la cinética de interacción entre el péptido SpyTag y el dominio SpyCatcher se utilizaron VLPs con una proporción 50:50 de las proteínas ST-VP2-CP69 y VP2, debido a que en esta proporción se observa prácticamente la desaparición de la banda completa de ST-VP2-CP69. Se siguió la interacción a lo largo del tiempo (0, 15, 30, 60, 120, 180, 240 y 300 min), para posteriormente analizarlo por SDS-PAGE (Fig. 25). Al analizar el gel se observó que después de los 120 min de interacción la banda de la proteína ST-VP2-CP69 prácticamente desapareció por completo, lo cual indica que el tiempo de interacción que se utiliza para la interacción (3 h) es suficiente para lograr la interacción con todos los extremos N-terminales externalizados y no hay la posibilidad de un sesgo de interacción por el tiempo transcurrido.

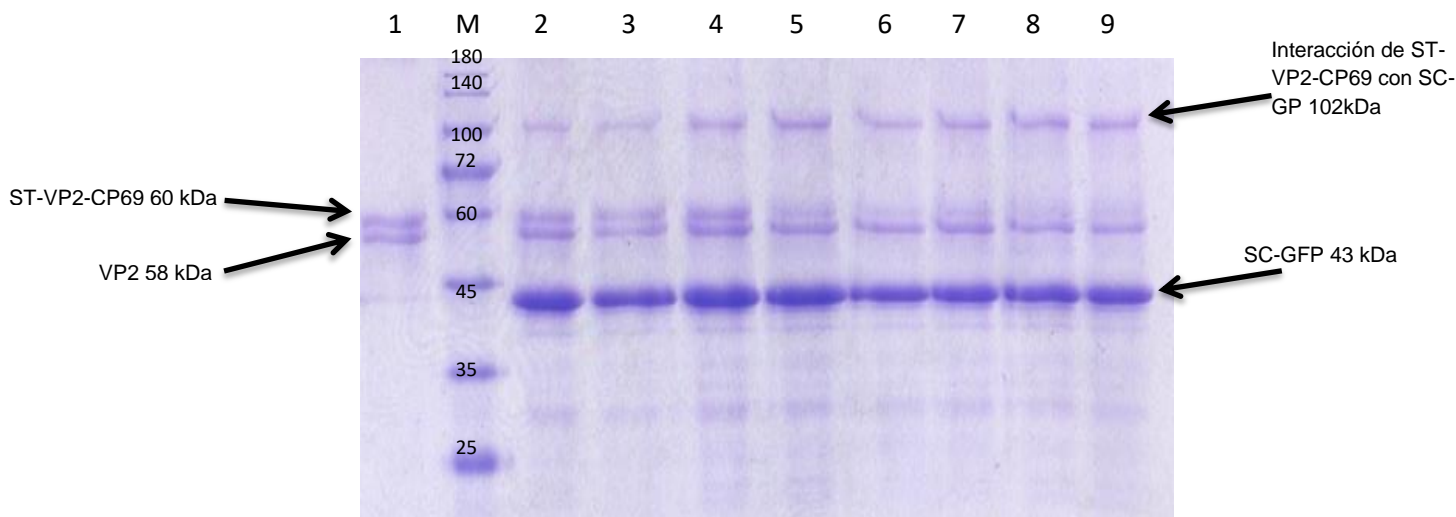


Figura 25. SDS-PAGE de la cinética de interacción entre el péptido SpyTag y el SpyCatcher a partir de VLPs con una proporción 50:50 (ST-VP2-CP69 y VP2). 1: VLP 50:50. 2: Interacción al tiempo 0. 3: Interacción a los 15 min. 4: Interacción a los 30 min. 5: Interacción a los 60 min. 6: Interacción a los 120 min. 7: Interacción a los 180 min. 8: Interacción a los 240 min. 9: Interacción a los 300 min.

### Purificación por SEC de VLPs fusionadas a SC-GFP

Se realizó la purificación de las partículas después de la interacción con la proteína SC-GFP para separar a las VLPs que interaccionaron de las que no y de este modo poder realizar la medición por fluorescencia. Se utilizó una columna Superdex 200 la cual, cumplía con el grado de resolución necesario para poder separar las partículas con SC-GFP de intermediarios de ensamble y de la proteína SC-GFP libre. Con este método se purificaron las VLPs formadas por ST-VP2-CP69, ST-VP2 y una mezcla de 1:1 VP2 ST-VP2-CP69 y VP2, así como de la proteína SC-GFP. El tiempo de retención de la proteína SC-GFP fue de 109 min, este dato fue utilizado para compararlo con los cromatogramas obtenidos posteriormente a partir de VLPs quiméricas fusionadas a SC-GFP (Fig. 26A). En la Figura 26B se observa el cromatograma de las VLPs formadas a partir de la proteína ST-VP2-CP69 y conjugadas con la proteína SC-GFP con un tiempo de retención de 61 min, en el minuto 109 se observa un pequeño pico de la proteína SC-GFP que no reaccionó

con el SpyTag de la partícula. En la Figura 26C se muestra el cromatograma de VLPs formadas a partir de la proteína ST-VP2 con un tiempo de retención de 75 min; sin embargo, no se observó claramente el pico de la proteína SC-GFP que no reaccionó, probablemente porque al ser una relación 1:1 de la reacción SpyTag/SpyCatcher interaccionó casi completamente, tanto con VLPs como con agregados e intermediarios, y en consecuencia la base del pico de absorbancia fue más ancha. Por el contrario, en la reacción de SC-GFP con las partículas de ST-VP2-CP69 si hubo una pequeña cantidad de SC-GFP que no interaccionó (Fig. 26D). Esta diferencia se debe principalmente a que el comportamiento del ensamble entre las distintas VLPs quiméricas puede variar debido a que hay VLPs más estables que otras (Gómez. 2019; Sánchez *et al.* 2012, 2016), lo cual influye principalmente en la formación de agregados durante el proceso de ensamblaje. Esto es un inconveniente en proteínas como ST-VP2-CP69, que al ser una proteína con más modificaciones que la proteína ST-VP2, tiende a ser menos estable. Como consecuencia de ello, al poner la misma concentración de proteína para el ensamblaje de las VLPs, una gran parte de esta se agrega, por lo que es eliminada en el paso de filtración previo a la inyección de las partículas en la columna. Por esta razón, se obtiene un pico con menor absorbancia (0.048) en el cromatograma de ST-VP2-CP69 que el de ST-VP2 (0.066), y se hace mas evidente el pico de SC-GFP remanente en el cromatograma de ST-VP2-CP69, ya que hay una menor cantidad de SpyTag disponible para reaccionar. En la Figura 26D se observa el cromatograma de VLPs formadas a partir de ST-VP2-CP69 y VP2 en una proporción 1:1, y conjugadas con la proteína SC-GFP, con un tiempo de retención de 73 min. Cabe destacar que los tiempos de retención varían de acuerdo con tamaño de las partículas obtenidas. Como ya se demostró anteriormente, mediante DLS, las VLPs formadas a partir de la proteína ST-VP2-CP69 poseen un diámetro hidrodinámico mayor que las VLPs de la proteína ST-VP2 y que las VLPs ensambladas en proporción 1:1, lo cual concuerda con lo obtenido en los cromatogramas (Fig. 26).

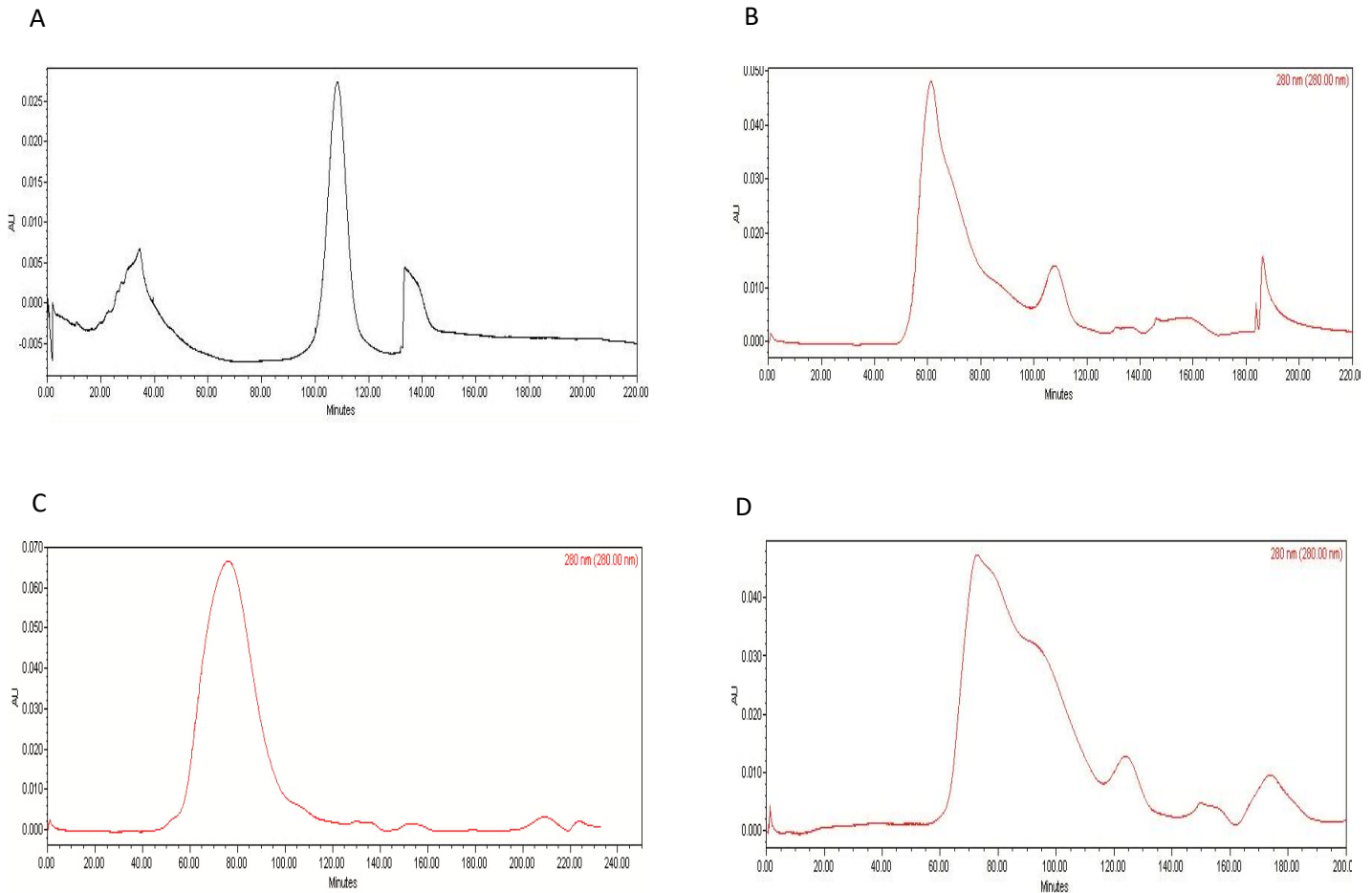
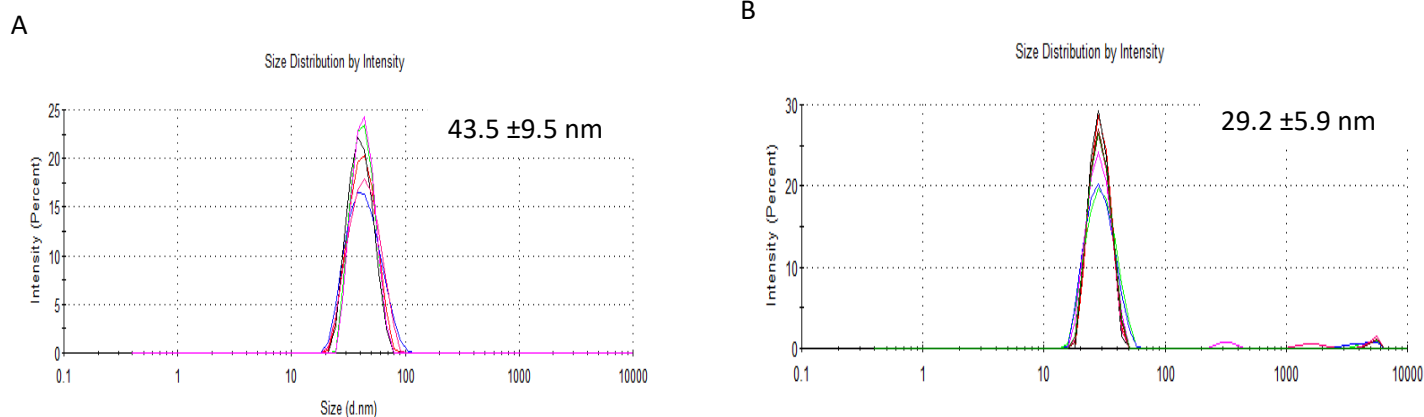


Figura 26. Cromatogramas de SC-GFP y VLPs quiméricas conjugadas con SC-GFP. A: SC-GFP. B: ST-VP2-CP69 + SC-GFP. C: ST-VP2 + SC-GFP. D: ST-VP2 + VP2-CP69 (1:1) + SC-GFP.

Posteriormente se analizaron las fracciones obtenidas mediante SEC por dispersión dinámica de luz para obtener el diámetro hidrodinámico de las partículas y de este modo obtener la fracción con los tamaños más cercanos a los esperados. En la Figura 27 se observa la caracterización de las VLPs por DLS en donde se determinaron partículas de ST-VP2-CP69 conjugadas con SC-GFP con un diámetro de 43.5 nm, aumentando el diámetro en ~7 nm con respecto al obtenido



anteriormente en las partículas sin conjugar con SC-GFP (Fig. 27A). Este cambio sugiere que efectivamente se llevó a cabo la reacción entre el SpyTag y el SpyCatcher. De igual manera, en la Figura 27B se determinó un diámetro de 40.6 nm de las VLPs formadas a partir de ST-VP2-CP69 y VP2 (1:1), en la cual también se observó un aumento en el diámetro de ~6 nm respecto a las partículas no conjugadas. En la Figura 27C se observa que las partículas formadas a partir de la proteína ST-VP2 aumentaron su diámetro en ~2 nm. En conjunto, los resultados indican que si se llevó a cabo la conjugación entre SC-GFP y las partículas decoradas con el péptido SpyTag, debido a que en trabajos previos Cayetano y colaboradores en el 2018 y 2019, comprobaron que la interacción se llevó a cabo tanto por el aumento en el peso molecular observado en el SDS-PAGE entre la proteína con el SpyCatcher y el SpyTag, como por el aumento en el diámetro hidrodinámico de las partículas de ~10 nm, valores muy cercanos a los obtenidos en el presente trabajo. Además, se logró separar a la proteína SC-GFP remanente mediante SEC. Por lo tanto, ahora es posible establecer la cantidad de dominios de GFP unidos a las VLPs mediante su fluorescencia.



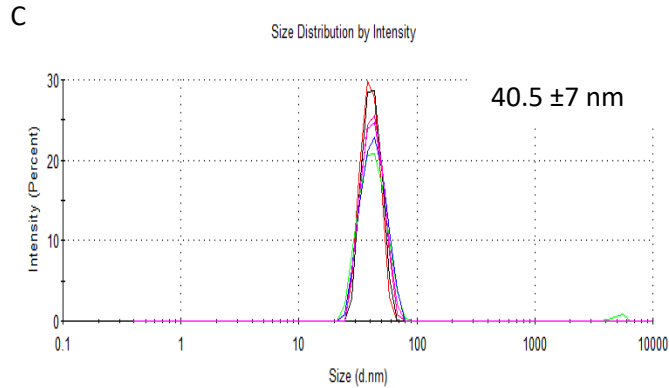


Figura 27. Análisis por DLS de las VLPs conjugadas con SC-GFP. A: ST-VP2-CP69. B: ST-VP2. C: VP2:ST-VP2-CP69 (1:1).

### Fluorescencia de VLPs quiméricas

Los espectros de emisión de fluorescencia de las partículas se midieron de acuerdo con las condiciones descritas en la metodología. Se observó que las VLPs formadas a partir de VP2, al no tener el péptido SpyTag no reaccionan con SC-GFP y por lo tanto no presentan fluorescencia (Fig. 28A). En la Figura 28B se encuentra el espectro de emisión de fluorescencia de las VLPs formadas por la proteína ST-VP2-CP69 y conjugadas con SC-GFP, que presentan el perfil característico de la GFP con un máximo de  $14762 \pm 16.9$  UA a 514 nm, que nos permite inferir que las VLPs tienen GFP unida. En el caso de las VLPs formadas a partir de la proteína ST-VP2 se obtuvo una intensidad de fluorescencia de  $14374 \pm 22.3$  UA a 514 nm (Fig. 28C), mientras que las partículas híbridas formadas por VP2:ST-VP2-CP69 (1:1) tuvieron  $12885 \pm 59.1$  UA a la misma longitud de onda (Fig. 28D). Este resultado era el esperado, ya que, teóricamente, solo la mitad de los monómeros tienen el péptido SpyTag en el N-terminal para conjugarse con SC-GFP, en consecuencia, la cantidad de fluorescencia obtenida es menor que en las otras partículas virales con una mayor capacidad de interaccionar con la molécula fluorescente y su SpyCatcher.

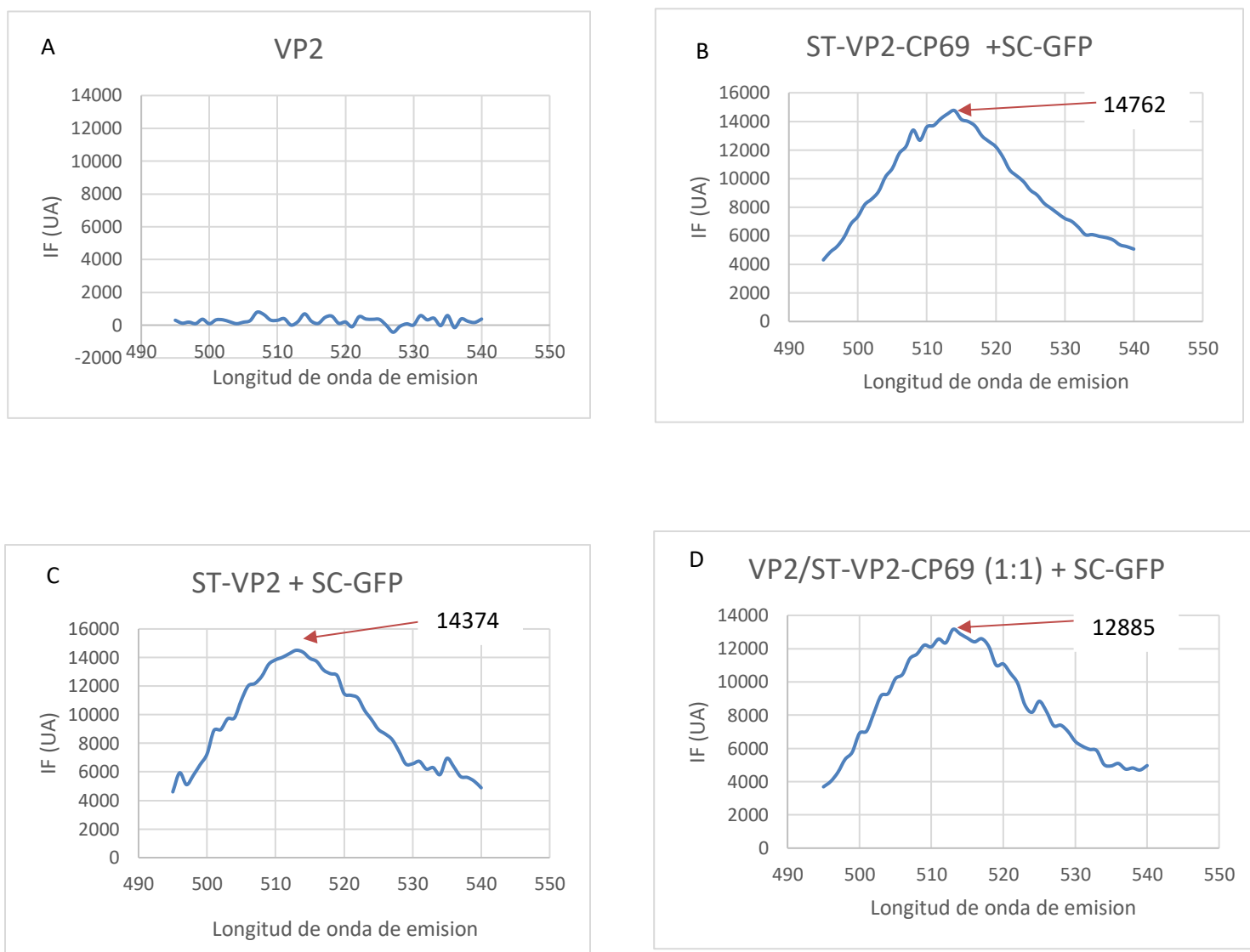


Figura 28. Intensidad de fluorescencia de VLPs de VP2 y VLPs quiméricas conjugadas con SC-GFP. A: VP2. B: ST-VP2-CP69 + SC-GFP. C: ST-VP2 + SC-GFP. D: VP2:ST-VP2-CP69 (1:1) + SC-GFP.

Posteriormente se utilizó una curva de calibración de SC-GFP para determinar el número de moléculas de SC-GFP acopladas a las partículas obtenidas por SEC (Fig. 29). De acuerdo con los datos de fluorescencia obtenidos arriba, y la curva de calibración, se calculó la cantidad de SC-GFP unida al péptido SpyTag. En el caso de VLPs de ST-VP2-CP69 la masa de SC-GFP unida fue de 7.22  $\mu\text{g}$ , la masa total

de las partículas, sin SC-GFP, es de 15.8 µg en todos los casos, la masa de SC-GFP es de 43 kDa y de ST-VP2-CP69 es de 64 kDa. Se calculó que las masas moleculares de SC-GFP y ST-VP2-CP69 corresponden a 0.168 y 0.2468 nmol respectivamente, la proporción molar de SC-GFP a ST-VP2-CP69, fue calculada de la siguiente manera  $0.168/0.247 = 0.68$ , que es el 68%, tomando en cuenta que cada partícula tiene 60 subunidades de la proteína ST-VP2-CP69, 68% de 60 es 40.8, que fue redondeado a 41 unidades acopladas de SC-GFP por VLP (Tabla 2). Respecto a las VLPs de ST-VP2, la masa de SC-GFP unida fue de 7.11 µg, la masa total de las partículas es de 15.8 µg, los pesos moleculares de SC-GFP y de ST-VP2 son de 43 y 63.8 kDa, y con ellos se calcularon los moles de SC-GFP y ST-VP2, que fueron 0.165 y 0.2476 nmol respectivamente. La proporción molar es  $0.165/0.248 = 0.66$ , que es el 66%, que corresponde a 39.6 subunidades modificadas, redondeado a 40 moléculas de GFP/VLP (Tabla 2). Por último, para las partículas formadas por una proporción molar de 1:1 (VP2/STCP69) la masa de SC-GFP acoplada fue de 6.68 µg, la masa total de VLPs es de 15.8 µg, considerando que es una mezcla equimolar, consideramos el promedio de los pesos moleculares de ST-VP2-CP69 y VP2 para el cálculo (61 kDa), que nos arrojó como resultado 0.155 y 0.259 nmol respectivamente. La proporción molar calculada fue  $0.155/0.259 = 0.59$  (59%), que corresponde a 35.4 monómeros de GFP por VLP, redondeando a 35 unidades acopladas (Tabla 2). Se esperaba que las VLPs de la proporción 1:1 tuvieran una menor cantidad de unidades acopladas debido a que teóricamente solo la mitad de sus subunidades poseen el péptido SpyTag. Con 35 unidades de SC-GFP acopladas de 60 subunidades en la cápside, valor cercano al 50% de las partículas acopladas, tenemos que el rendimiento es prácticamente el 100%. En contraste, las VLPs cuyas 60 subunidades tienen el péptido SpyTag (ST-VP2-CP69 y ST-VP2), tuvieron una cantidad mayor de SC-GFP acopladas a su superficie, pero no se acercaron al 100% de eficiencia. Esto podría deberse a un impedimento estérico generado por las unidades de SC-GFP que lograron reaccionar, y las SC-GFP entrantes, o a una disminución en la fluorescencia debida a reacciones de apagamiento producidas por la cercanía de las SC-GFP. En el caso de las VLPs de ST-VP2, se acoplaron 40 unidades de SC-GFP (66%) a pesar de

tener la capacidad de acoplar el 100% de moléculas fluorescentes. Este resultado fue el esperado, ya que se ha comprobado que las VLPs de B19V no son capaces de externalizar todos los extremos N-terminales a través del poro que existe en el eje de orden 5, llegando a externalizar únicamente de 2 a 3 extremos N-terminales por eje de orden cinco (Kaufmann *et al.*, 2008). Por otra parte, Cayetano y colaboradores en el 2018 demostraron mediante análisis densitométricos, que la construcción realizada de VP2 con el SpyTag en el N-terminal es capaz de externalizar una mayor cantidad de estos extremos aproximadamente de 3 a 4 por eje de orden 5, concordando con los resultados derivados de los experimentos realizados en este trabajo para las VLPs formadas por la proteína ST-VP2.

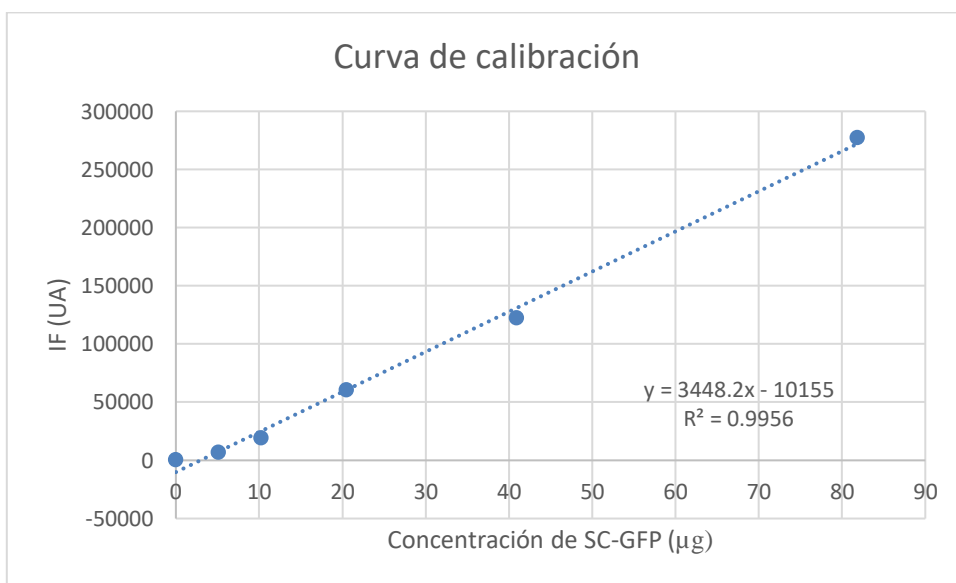


Figura 29. Curva de calibración de la proteína SC-GFP.

Tabla 2. Datos de fluorescencia obtenidos de las VLPs formadas por las proteínas ST-VP2-CP69, VP2 ST-NH y 1:1 (VP2/ST-VP2-CP69), todos los datos se adquirieron a partir de una concentración de 15.8 µg de VLPs en cada muestra.

	Intensidad de Fluorescencia (UA)	Masa de VLPs (µg)	Masa de SC-GFP (µg)	Proporción molar	Número de SC-GFP acopladas por VLP
<b>ST-VP2-CP69</b>	14762±16.9	15.8 (0.247)	7.22 (0.168)	0.168/0.247=0.68 (68%)	41
<b>ST-VP2</b>	14374±22.3	15.8 (0.248)	7.11 (0.165)	0.165/0.248=0.66 (66%)	40
<b>VP2:ST-VP2-CP69 1:1</b>	12885±59.1	15.8 (0.259)	6.68 (0.155)	0.155/0.259=0.59 (59%)	35

Entre paréntesis: masa de cada especie en nmol

Nuestros resultados sugieren que los extremos amino terminales se encuentran expuestos en la superficie de las VLPs formadas por la proteína ST-VP2-CP69. Sin embargo, solo interaccionaron 41 extremos N-terminales de los 60 disponibles. Es posible que esto se deba al impedimento estérico que se pudiese ocurrir entre las proteínas SC-GFP ya conjugados con la VLP y las nuevas proteínas no conjugadas.

Tanto el aumento en el diámetro medido por DLS (Fig. 18), como la disminución en el tiempo de retención de las VLPs en SEC (Fig. 21), y la fluorescencia de las partículas purificadas, nos asegura la unión de la proteína SC-GFP a las VLPs (Fig. 28). Por otra parte, es relevante conocer la capacidad de este sistema para interaccionar con proteínas de diferente tamaño, para evaluar su rendimiento en función de las propiedades de la proteína que se desea conjugar.

## 5. Conclusiones

- ❖ La permutación circular en el residuo de aminoácido 69 y la fusión de la secuencia del péptido SpyTag en el N-terminal no impide la expresión, ni su posterior purificación de la proteína ST-VP2-CP69.
- ❖ ST-VP2-CP69 es capaz de participar en la formación de VLPs o con distintas proporciones de esta proteína y la proteína VP2, corroborando que la permutación circular en el residuo de aminoácido 69 y el péptido SpyTag en el N-terminal no interfiere en la formación de partículas.
- ❖ Las VLPs formadas a partir de ST-VP2-CP69 pueden unir a SC-GFP comprobando la externalización de los extremos N-terminales. Sin embargo, es probable que el impedimento estérico evite la unión de SC-GFP en aproximadamente el 32% de los extremos N-terminales disponibles.

## 6. Perspectivas

- Confirmar la cuantificación de la conjugación de SC-GFP con las diferentes VLPs.
- Caracterizar por AFM y TEM las VLPs restantes (50:50) así como las VLPs unidas a SC-GFP.
- Comprobar la interacción entre las VLPs de la proteína ST-VP2-CP69 y únicamente la proteína SpyCatcher, como modelo de proteína pequeña.

## 7. Anexo

### Materiales

Reactivo	Marca
Acetato de Potasio	Sigma
Ácido acético glacial	Sigma
Ácido bicinconínico (BCA)	Sigma-Aldrich
Ácido clorhídrico	Sigma
Ácido etilendiamino tetracético (EDTA)	Sigma
Ácido fosfotúngstico 3%	Fisher scientific
Agar LB (Luria-Bertani)	Difco
Agarosa UltraPure TM	Invitrogen
Albumina	Sigma
Ampicilina	Sigma-Aldrich
Azul brillante R-250	Sigma
Bromuro de Etidio	Sigma
Cloroformo	Sigma
Clorhidrato de Guanidina (GdnHCl)	Sigma
Cloruro de Cesio (CsCl)	Sigma
Cloruro de Potasio (KCl)	Sigma
Cloruro de Sodio (NaCl)	Sigma
Cutsmart (Amortiguador para digestión enzimática)	New England Biolabs
DNA Ligasa de T4	New England Biolabs
Dodecilsulfato de Sodio (SDS)	Sigma
Etanol	J. T. Baker
Fenol saturado de amortiguador	Sigma
Fosfato de Potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Sigma
Fosfato de Sodio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Sigma
Fosfato de Sodio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )	Sigma
Glicerol	Gibco BRL
Hidróxido de Sodio (NaOH) Sigma	Sigma
HisTrap HP	GE Healthcare



HiTrap Q HP anion exchange chromatography column	GE Healthcare
Imidazol	Sigma
Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG)	Sigma
L-Arginina	Sigma
Medio LB (Luria-Bertani)	Sigma
Metanol	Química Delta
Membrana para diálisis	Sigma
Matriz para cromatografía de afinidad	Protino™ Ni-TED
Matriz para cromatografía de exclusión molecular	Sephacryl S-500 HR
Matriz HiLoad Superdex 200 prep grade	GE Healthcare
RNAsa	Thermo Scientific™
Sulfato de Níquel (NiSO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich
Tris-HCl	Sigma
Triton X-100	Sigma
1,4-Ditiotreitol (DTT)	Sigma
2-mercaptoetanol	Sigma-Aldrich

<b>Instrumento o equipo</b>	<b>Marca</b>
Amicon Ultra-15 (50 kDa)	Millipore
Balanza analítica BP 221S	Sartorius
Centrifuga refrigerada RC	Thermo Scientific Instruments
Centrifuga refrigerada 5702 R	Eppendorf
Cromatógrafo de líquidos de alta resolución	Waters
Espectrofotómetro CARY 400	Varian
Fuente de poder PS 500XT	Hoefer Scientific Instruments
Microcentrifuga refrigerada 5418	Eppendorf
Micropipetas (1, 2.5, 10, 100, 200, 1000)	Eppendorf/Gilson
Microscopio de fuerza atómica	Veeco Instruments Inc.
Microscopio de transmisión Tecnai 12	Phillips
Potenciómetro pH 700	Oakton

Sonicador CPX 750	Cole Parmer
Speed Vac SC110	Savant
Trans-iluminador UV T1203	Sigma
Termomixer confort	Eppendorf
Ultracentrífuga Optima™ XL-100K Class S	Beckman
Vortex	Gilson
Zetataiser μV	Malvern Instruments

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

## 8. Referencias

- Blum A. S., Soto C. M., Wilson C. D., 2005. An engineered virus as a scaffold for three dimensional self-assembly on the nanoscale. *Small*. 1(7): 702-706.
- Bönsch C., Zuercher C., Lieby P., Kempf C., Ros C., 2010. The Globoside Receptor Triggers Structural Changes in the B19 Virus Capsid That Facilitate Virus Internalization. *Journal of Virology*, 84(22): 11737–11746.
- Brown C. S., Van Lent J. W. M., Vlak J. M., Spaan W. J. M., 1991. Assembly of Empty Capsids by Using Baculovirus Recombinants Expressing Human Parvovirus B19 Structural Proteins. *Journal of Virology*. 65(5): 2702-2706.
- Brune K., Leneghan D., Brian I., Ishizuka A., Bachmann M., Draper S., Biswas S. & Howarth M., 2016. Plug-and-Display: decoration of Virus-Like Particles via isopeptide bonds for modular immunization. *Scientific Reports*. 6: 19234.
- Cayetano-Cruz, M., Coffeen, C. F., Valadez-García, J., Montiel, C., & Bustos-Jaimes, I., 2018. Decoration of virus-like particles with an enzymatic activity of biomedical interest. *Virus Research*, 255: 1–9.
- Cayetano-Cruz M., Valadez-García J., Méndez C., Bustos-Jaimes I., 2019. Virus-like Nanoparticles Derived from Parvovirus B19 Efficiently Internalize in Human Hepatocytes: A Biocompatible Delivery System for Peptides and Proteins. *ACS Applied Nano Materials*. 2 (10): 6178-6186.
- Chow M., Basavappa R., Hogle J.M., Chiu W., Garce R., Burnette R., 1997. *Structural Biology of Viruses*. Oxford University Press. 157-186 pp.
- Coffen C. C. F., 2018. Presentación del péptido SpyTag sobre la superficie de partículas tipo virus como un sistema de acoplamiento

de proteínas (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. México.

- Cunningham M. W., 2000. Pathogenesis of Group A Streptococcal Infections. 2000. *Clinical Microbiology Reviews*. 13 (3): 470-511
- Deivanayagam CC, Rich RL, Carson M, Owens RT, Danthuluri S, Bice T, Höök M, Narayana SV., 2000. Novel fold and assembly of the repetitive B region of the *Staphylococcus aureus* collagen-binding surface protein. *Structure*. 8(1): 67-78.
- Douglas, T., Young, M., 1998. Host–guest encapsulation of materials by assembled virus protein cages. *Nature*. 393: 152–155.
- Fairhead M., Veggiani G., Lever M., Yan J., Mesner D., Robinson C. V., Dushek O., van der Merwe P. A., Howarth M., 2014. SpyAvidin hubs enable precise and ultrastable orthogonal nanoassembly. *J Am Chem Soc*. 136(35):12355-12363.
- Gallinella, G., 2013. Parvovirus B19 achievements and challenges. *ISRN Virol*. 2013: 1-33.
- Gamboa-Melendez H., Larroude M., Park Y.K., Trebul P., Nicaud J.M., Ledesma-Amaro R., 2018. Synthetic Biology to Improve the Production of Lipases and Esterases (Review). In: Sandoval G. (eds) *Lipases and Phospholipases. Methods in Molecular Biology*, 1835: 229-242.
- Gilbert L., Toivola J., White D., Ihalainen T., Smith W., Lindholm L., 2005. Molecular and structural characterization of fluorescent human parvovirus B19 virus-like particles. *Biochem. Biophys. RES. Comm*. 331(2): 527-535.
- Gómez B. S. A., 2019. Construcción y caracterización de nanoacarreadores biocatalíticos basados en partículas tipo virus (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Hagan R. M., Björnsson R., McMahon S. A., Schomburg B., Braithwaite V., Bühl M., Naismith J. H., & Schwarz-Linek U., 2010.

NMR spectroscopic and theoretical analysis of a spontaneously formed Lys-Asp isopeptide bond. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 49(45): 8421–8425.

- Hull R., 2014. Chapter 13 - Assay, Detection, and Diagnosis of Plant Viruses. En R. Hull, *Plant Virology* (págs. 775-808). 5th Ed. Academic Press.
- Hu X., Hu H., Melvin J. A., Clancy K. W., McCafferty D. G., Yang W., 2011. Autocatalytic intramolecular isopeptide bond formation in gram-positive bacterial pili: a QM/MM simulation. *J Am Chem Soc.* 133(3): 478-485.
- Inoue H., Nojima H., Okayama H., 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* 96(1): 23-28.
- Kajigaya S., Fujii H., Field A., Anderson S., Rosenfeld S., Anderson L.J., Shimada T., Young N.S., 1991. Self-assembled B19 parvovirus capsids, produced in a baculovirus system, are antigenically and immunogenically similar to native virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88(11): 4646–4650.
- Kang HJ, Coulibaly F, Clow F, Proft T, Baker E.N., 2007. Stabilizing isopeptide bonds revealed in gram-positive bacterial pilus structure. *Science.* 318(5856): 1625-8.
- Kaufmann B., Chipman P., Kostyuchenko V., Modrow S. & Rossmann M., 2008. Visualization of the Externalized VP2 N Termini of Infectious Human Parvovirus B19. *Journal of virology*, 82(15): 7306–7312.
- Kaufmann B., Simpson A., & Rossmann M., 2004. The structure of human parvovirus B19. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 101(32): 11628–11633.
- Leisi R, Di Tommaso C, Kempf C, Ros C., 2016 The Receptor-Binding Domain in the VP1u Region of Parvovirus B19. *Viruses.*8(3): 61.
- Leisi R, Ruprecht N, Kempf C, Ros C., 2013. Parvovirus B19 uptake is a highly selective process controlled by VP1u, a novel determinant of viral tropism. *J Virol.* 87(24): 13161-13167.

- Liu Z., Zhou H., Wang W., Tan W., Fu Y. X., Zhu M., 2014. A novel method for sunthetic vaccine construcción based on protein assembly. *Sci Rep.* 4: 7266
- Mateu, M.G., 2011. Virus engineering: functionalization and stabilization. *Protein Engineering, Design & Selection.* 24(1-2): 53–63.
- Mora M., Bensi G., Capo S., Falugi F., Zingaretti C., Manetti A. G. O., Maggi T., Taddei A. R., Grandi G., Telford J. L., 2005. Group A Streptococcus produce pilus-like structures containing protective antigens and Lancefield T antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 102 (43): 15641-15646.
- Munakata, Y., Saito-Ito T., Kumura-Ishii K., Huang J., Kodera T., Ishii T., Hirabayashi Y., Koyanagi Y., and Sasaki T., 2005. Ku80 autoantigen as a cellular coreceptor for human parvovirus B19 infection. *Blood* 106(10): 3449– 3456.
- Naides S. J., 1999. Infection with parvovirus B19. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 1(3): 273-278.
- Noad R. & Roy P., 2003. Virus-like particles as inmunogens. *TRENDS in Microbiology.* 11(9): 438-444.
- Plummer E. M. & Manchester M., 2011. Viral nanoparticles and virus-like particles: platforms for contemporary vaccine design. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology.* 3(2): 174-196.
- Reddington S. & Howarth M., 2015. Secrets of a covalent interaction for biomaterials and biotechnology: SpyTag and SpyCatcher. *Current Opinion in Chemical Biology.* 29: 94-99.
- Rogo L. D., Mokhtari A. T., Kabir M. H., Rezaei F., 2014. Human parvovirus B19: A review. *Acta virológica.* 58(3): 199 – 213.
- Ros C., Baltzer C., Mani B., & Kempf C., 2006. Parvovirus uncoating in vitro reveals a mechanism of DNA release without capsid disassembly and striking differences in encapsidated DNA stability. *Virology.* 345(1): 137–147.

- Sánchez-Rodríguez S. P., Enriquez A. J. V., Soto F. J. M., Peña M. C., Bustos-Jaimes. I., 2014. In vitro encapsulation of heterologous dsDNA into human parvovirus B19 virus-like particles. *Mol. Biotech.* 57(4): 309-317.
- Sánchez-Rodríguez S.P., Morán-García, A.C., Bolonduro O., Dordick J.S., Bustos-Jaimes I., 2016. Enhanced assembly and colloidal stabilization of primate erythroparvovirus 1 virus-like particles for improved surface engineering. *Acta Biomater.* 35: 206–214.
- Sánchez-Rodríguez, S.P., Münch-Anguiano, L., Echeverría, O.M., Vázquez-Nin, G.H., Mora-Pale, M., Dordick, J.S., Bustos-Jaimes, I., 2012. Human parvovirus B19 viruslike particles: in vitro assembly and stability. *Biochimie.* 94(3): 870–878.
- Santillán J., Valadez J., Morán A., Santillán H., Bustos-Jaimes I., 2015. Peptide display on a surface loop of human parvovirus B19 VP2: Assembly and characterization of virus-like particles. *Virus Research.* 201: 1-7.
- Schoene C., Fierer J.O., Bennett S.P., Howarth M., 2014. SpyTag/SpyCatcher cyclization confers resilience to boiling on a mesophilic enzyme. *Angew Chem Int.* 53(24): 6101-6104.
- Shishovs, M., Rumnieks, J., Diebolder, C., Jaudzems, K., Andreas, L.B., Stanek, J., Kazaks, A., Kotelovica, S., Akopjana, I., Pintacuda, G., Koning, R.I., Tars, K., 2016. Structure of AP205 coat protein reveals circular permutation in ssRNA bacteriophages. *J Mol Biol.* 428(21): 4267–4279.
- Soto C. & Ratna B., 2010. Virus hybrids as nanomaterials for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology.* 21(4): 426–438.
- Sun F., Zhang W. B., Mahdavi A., Arnorld F. H., Tirrell D. A., 2014. Synthesis of bioactive protein hydrogel by genetically encoded SpyTag-SpyCatcher chemistry. *Proc Natl Acad Sci.* 111(31): 11269-11274.

- Symersky J., Patti J. M., Carson M., House-Pompeo K., Teale M., Moore D., Jin L., Schneider A., DeLucas L. J., Höök M., Narayana S.V., 1997. Structure of the collagen-binding domain from a *Staphylococcus aureus* adhesin. *Nat Struct Biol.* 4(10): 833-8.
- Terasaka N., Azuma Y. Hilvert D., 2018. Laboratory evolution of virus-like nucleocapsids from nonviral protein cages. *PNAS Latest Articles.* 115(21): 5432-5437.
- Weigel-Kelley K. A., Yoder M. C., and Srivastava A., 2003. Alpha5beta1 integrin as a cellular coreceptor for human parvovirus B19: requirement of functional activation of beta1 integrin for viral entry. *Blood* 102(12): 3927–3933.
- Weigel-Kelley K. A., Yoder M. C., Chen L., and Srivastava A., 2006. Role of integrin cross-regulation in parvovirus B19 targeting. *Hum. Gene Ther.* 17(9):909–920.