

FACULTAD DE QUIMICA, UNAM.

DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES.

"ANALISIS ESPECTROFOTOMETRICO DEL CITOCROMO P-450 EN
DIVERSAS CONDICIONES EXPERIMENTALES QUE MODIFICAN LA
LIPOPEROXIDACION CELULAR EN SUPRARRENAL DE MAMIFEROS"

TESIS DE MAESTRIA EN CIENCIAS
QUIMICAS (BIOQUIMICA).

MEXICO, D. F., 1978

EMILIO MARQUEZ PAZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADEZCO A:

Dr. Gustavo Martínez Z., la dirección de la Tesis.

M. en C. Zaida Orta F., el estímulo, discusión, y la colaboración en el desarrollo del trabajo.

Dr. Oscar Domínguez V., las facilidades prestadas, ya que sin su ayuda hubiera sido más difícil la conclusión de la Tesis.

EL TRABAJO DE TESIS FUE DESARROLLADO EN LOS LABORATORIOS DE LA SECCION DE BIOQUIMICA DE ESTEROIDES, DIVISION DE BIOQUIMICA, SUBJEFATURA DE INVESTIGACION BASICA, CENTRO MEDICO NACIONAL, INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.

Tabla de contenido

Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	3
1.1.1 Citocromo P450.....	3
1.1.2 Citocromo P450 102A1 (P450BM3)	4
1.1.3 Terapia enzimática de activación de profármacos	5
1.1.4 Partículas tipo virus (VLPs)	5
1.1.5 Bacteriófago P22	6
1.1.6 Encapsidación de enzimas	7
1.1.7 Encapsidación de CYP	9
1.2 Justificación	9
1.3 Hipótesis	10
1.4 Objetivos	10
1.4.1 Objetivo general	10
1.4.2 Objetivos específicos	10
Capítulo 2. Metodología	11
2.1 Construcción de los plásmidos pBAD CYPTFFIS y pBAD CYPWMV	11
2.1.1 Amplificación CYPTFFIS, CYPWMV y SP	11
2.1.2 Digestión de los productos CYPTFFIS y CYPWMV y el plásmido pBAD/His C	12
2.1.3 Ligación del vector pBAD/His C con los fragmentos CYPTFFIS y CYPWMV	13
2.2 Construcción de los plásmidos pBAD CYPTFFIS-SP y CYPWMV-SP	14
2.2.1 Digestión del fragmento SP y los plásmidos pBAD CYPTFFIS y pBAD CYPWMV	14
2.2.2 Ligación de los plásmidos pBAD CYPTFFIS y pBAD CYPWMV con la SP	14
2.3 Expresión secuencial de CYPWMV-SP, CYPTFFIS-SP y CP P22.....	16
2.4 Purificación de las VLPs P22- CYPTFFIS y VLPs P22-CYPWMV	16
2.5 Determinación de la concentración y actividad de las VLPs P22-CYPTFFIS y VLPs P22-CYPWMV	17

Capítulo 3. Resultados y Discusión	19
3.1 Construcción de los plásmidos pBAD CYPTFFIS-SP y pBAD CYPWMV-SP	19
3.1.1 Purificación de plásmidos	19
3.1.2 Amplificación de los fragmentos CYPTFFIS, CYPWMV y SP	20
3.1.3 Digestión doble de CYPTFFIS, CYPWMV y del plásmido pBAD/His C	21
3.1.4 Ligación de los fragmentos CYPTFFIS, CYPWMV con el plásmido pBAD/His C	22
3.1.5 Digestión doble de SP, pBAD CYPTFFIS y pBAD CYPWMV	24
3.1.6 Ligación del fragmento SP con los plásmidos pBAD CYPTFFIS y pBAD CYPWMV	26
3.2 Análisis de la expresión a pequeña escala de CYP-SP y CP	28
3.3 Expresión secuencial de CYP-SP y CP P22	30
3.4 Purificación de VLPs P22 CYPTFFIS y VLPs P22 CYPWMV	33
3.5 Análisis de las VLPs por medio de DLS y TEM	38
3.6 Determinación de la actividad CYP de VLPs P22-CYP	41
Capítulo 4. Conclusiones	44
Capítulo 5. Perspectivas	45
Literatura citada	46
Anexos	49

Lista de figuras

Figura 1. Modelo estructural de los tres subdominios de la CYP	4
Figura 2. Estructura de la cápside del bacteriófago P22.....	7
Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los plásmidos purificados	19
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR.....	21
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de digestión (NcoI y XhoI) purificados.....	22
Figura 6. Análisis electroforético del PCR de colonia correspondiente a las dos construcciones.	23
Figura 7. Análisis electroforético del PCR (A) y digestión doble (NcoI y XhoI) (B) de las construcciones pBAD CYP _{TFFIS} y pBAD CYP _{WMV}	24
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de digestión (XhoI y EcoRI) purificados	25
Figura 9. Análisis electroforético del PCR de colonia correspondiente a las construcciones pBAD CYP _{WMV} -SP y pBAD CYP _{TFFIS} -SP.....	26
Figura 10. Análisis electroforético del PCR y digestión doble (XhoI y EcoRI) de las construcciones pBAD CYP _{TFFIS} -SP y pBAD CYP _{WMV} -SP	27
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR CYP y CYP-SP.....	28
Figura 12. SDS-PAGE al 10% de la sobreexpresión de CYP-SP y CP.	29
Figura 13. Esquema de inducción para la encapsulación in vivo de CYP-SP en P22.....	31
Figura 14. SDS-PAGE al 10% de expresión secuencial de la CYP-SP y de CP a 30°C.....	32
Figura 15. SDS-PAGE al 10% del primer paso de purificación de las dos variantes CYP _{TFFIS} -SP y CYP _{WMV} -SP	33
Figura 16: Análisis de la formación de VLPs P22-CYP a 30 °C	36
Figura 17. Análisis de la formación de VLPs P22-CYP a 37°C mediante cromatografía de filtración en gel	37
Figura 18. Caracterización estructural de las VLP VLP P22-CYP _{WMV}	39
Figura 19. Caracterización estructural de las VLP VLP P22-CYP _{TFFIS}	40
Figura 20. Representación del ensamble y actividad de las VLP P22-CYP	41
Figura 21. Grafica de actividad de VLPs P22-CYP variantes TFFIS y WMV	42

Lista de tablas

Tabla 1. Encapsidación de múltiples enzimas en VLPs.	8
Tabla 2. Oligonucleótidos para la amplificación por PCR de las CYP's y la SP.	11
Tabla 3. Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa.	12
Tabla 4. Cuantificación de los vectores pBAD CYP-SP, pRSF CP P22, pRSFDuet-1-BM3-WMV, pRSFDuet-1-BM3-TFFIS y pBAD/His C a 260 nm.	20
Tabla 5. Cuantificación del vector pBAD/His C y los fragmentos CYP _{TFFIS} y CYP _{WMV} purificados antes y después de la digestión.	21
Tabla 6. Cuantificación de los vectores pBAD CYP _{TFFIS} y pBAD CYP _{WMV} y el fragmento SP purificados antes y después de la digestión.	25
Tabla 7. Número de enzimas CYP por cápside.	34
Tabla 8. Actividades específicas de los VLPs P22-CYP.	42

Capítulo 1. Introducción

La nanotecnología es la habilidad de trabajar a niveles atómicos y moleculares de la materia (a una escala de $\approx 1-100$ nm), para entender, crear y usar materiales, aprovechando las propiedades y funciones provenientes de su tamaño nanométrico. La bionanotecnología es la parte de la nanotecnología que aplica los principios y técnicas de la nanociencia para entender y transformar biosistemas o biomoléculas (Roco, 2003). Dentro de estas biomoléculas están las nanopartículas virales o VLPs (en inglés, "virus-like particles"), las cuales han adquirido gran interés por parte de investigadores en el área de nanomedicina debido a que pueden proteger y transportar biomoléculas a través de diversos medios y liberar su contenido en un lugar específico (Yildiz et al., 2011).

Los virus, en su forma más simple, se componen de proteínas estructurales (cápside) y ácidos nucleicos (ARN o ADN). Las partículas tipo virus (VLPs) están formadas por diferentes subunidades de proteínas estructurales que se autoensamblan bajo condiciones específicas y no poseen ácidos nucleicos, por lo que carecen de patogenicidad. En años recientes, una gran variedad de VLPs se han utilizado como andamios para la fabricación de nanomateriales. La función de la cápside en los virus es proteger el ácido nucleico, por lo que las cápsides virales son estables y rígidas, lo cual las hace una excelente herramienta para aplicaciones bionanotecnológicas (Steinmetz & Evans, 2007; Zeltins, 2013).

Las proteínas provenientes de la cápside de virus pueden ser aisladas y modificadas para su uso como nanovehículos y presentan las siguientes ventajas: 1) los virus son monodispersos en tamaño y composición bajo ciertas condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica; 2) se encuentran en distintas formas (comúnmente icosaedros, esferas, tubos y hélices); 3) por su arreglo tridimensional, un espacio interno vacío que le permite contener diferentes partículas y moléculas; 4) poseen poros por los cuales pueden atravesar moléculas pequeñas y a su vez son impermeables a el paso de moléculas grandes (p. ej. enzimas proteolíticas); 5) presentan capacidad de autoensamblarse en nanopartículas (NPs) de tamaño y forma discretas, con un alto grado de simetría y polivalencia que las hace nanopartículas únicas; 6) son estables a variaciones de pH, temperatura y distintos solventes; 7) tienen una gran área superficial; 8) debido a que están constituidas de proteínas, son consideradas biocompatibles y biodegradables (Lee, Niu, & Wang, 2009; Steinmetz & Evans, 2007; Strable & Finn, 2009).

Debido a las características previamente descritas, las cápsides virales pueden ser utilizadas para proteger y transportar una molécula no-nativa con la finalidad de desarrollar nanovehículos con gran estabilidad. Estas proteínas de cápside se han utilizado para encapsular metales, polímeros, proteínas, enzimas,

ADN, fármacos y agentes terapéuticos con un efecto sinérgico entre la molécula contenida y el nanomaterial resultante, lo que indica que tienen una alta capacidad de carga y es una barrera contra el reconocimiento por el sistema inmune (O'Neil et al., 2013). Uno de los mayores retos en el desarrollo de nuevas tecnologías biomédicas es disminuir o eliminar la respuesta inmune del cuerpo durante tratamientos con nanomateriales, las nanopartículas virales pueden ser cubiertas con polímeros que las vuelven invisibles al sistema inmune.

En trabajos recientes se han encapsulado enzimas dentro de cápsidas virales, generando nanomateriales con propiedades catalíticas distintas a las que tendría una enzima sin encapsular. Dentro de estos trabajos está la utilización de cápsidas virales que contienen enzimas de la familia de los citocromos P450 que tienen como objetivo activar un fármaco con efectos quimioterapéuticos (Sánchez-Sánchez, 2014; Sánchez-Sánchez et al., 2015; Tapia-Moreno et al., 2017).

Los citocromos P450 (CYPs) comprenden una gran familia de hemoproteínas, las cuales catalizan una gran variedad de reacciones y son la principal vía de biotransformación en el cuerpo para compuestos endógenos y exógenos. Dependiendo de la estructura del sustrato, las enzimas CYP catalizan un amplio rango de reacciones de monooxigenación (inserción de un átomo de oxígeno) incluyendo hidroxilaciones de grupos alifáticos y aromáticos, desalquilaciones, desaminaciones, oxidaciones y deshalogenaciones (Guengerich, 1993). Debido a que tienen la capacidad natural de transformar una gran variedad de compuestos exógenos, la industria farmacéutica ha prestado particular interés en desarrollar fármacos quimioterapéuticos que puedan ser transformados por dichas enzimas.

Una gran diversidad de compuestos químicos se utiliza como fármacos quimioterapéuticos, la mayoría de éstos son administrados como profármacos, los cuales deben ser "activados" mediante biotransformación química realizada por el citocromo P450 y así tener un efecto citotóxico.

Las CYPs en humanos se encuentran en casi todos los tejidos pero las concentraciones y la expresión de dichas enzimas varía entre estos, siendo el hígado el que contiene la mayor cantidad de CYPs involucrados en la biotransformación de fármacos (Guengerich, 1993).

Para utilizar a las CYPs como agentes terapéuticos es necesario dirigirlos a un órgano diana para aumentar la concentración de CYP en células cancerígenas y ahora el profármaco se transforme preferentemente en células cancerígenas y ahí ejerza su efecto citotóxico. En este trabajo se propone desarrollar

partículas virales con actividad citocromo P450 para su posible uso en la activación de un profármaco con efectos quimioterapéuticos.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Citocromo P450.

En 1958, Klingenberg reportó que había una lectura en el espectro de un “citocromo inusual”, el cual había sido aislado de las mitocondrias de células de hígado. Posteriormente en 1962, Sato y Omura le dieron el nombre de citocromo P450 (CYP) debido a que se observaba un máximo de absorbancia a 450 nm (Lewis, 2001).

Hoy en día se sabe que casi todos los organismos poseen CYPs, incluyendo arqueas, procariontes y eucariontes (Lewis, 2001). En el año 2000, Hosea y colaboradores reportaron que se habían encontrado 1200 genes que codificaban para diferentes CYPs y que dichos genes son altamente polimórficos (Hosea, Miller, & Guengerich, 2000), lo que indica que existe una gran variabilidad en las formas de las CYPs producidas por diferentes organismos. Las CYPs comprenden una gran familia de hemoproteínas, las cuales catalizan una gran variedad de reacciones y son la principal vía de biotransformación en el cuerpo para compuestos endógenos y xenobióticos. La reacción básica catalizada por estas enzimas es la monooxigenación (inserción de un átomo de oxígeno) incluyendo hidroxilaciones de grupos alifáticos y aromáticos, desalquilaciones, desaminaciones, oxidaciones y deshalogenaciones (Guengerich, 1993).

Las CYPs son parte de un complejo multienzimático, que para poder oxidar un sustrato necesita contar con proteínas que transfieran electrones del NADPH (o NADH) al átomo de hierro embebido en el grupo hemo de la CYP. Las CYPs generalmente se dividen en dos clases, la clase I depende de la ferredoxina-NADPH reductasa como fuente de electrones, mientras que las CYPs de la clase II están asociados a dos flavoproteínas (FAD y FMN) las cuales actúan como reductasa para transferir los electrones del NADPH hasta el dominio hemo de la CYP. Sin embargo, esta clasificación no fue suficiente a medida que se fueron descubriendo nuevos mecanismos redox de las CYP, conllevando a una nueva diferenciación. Hannemann y colaboradores en el 2007 publicaron una recopilación de los sistemas redox de las CYP P450 y las clasificó en clases I-X (Hannemann, Bichet, Ewen, & Bernhardt, 2007). La diferencia entre estas clases radica en el cofactor que actúa como agente reductor (NADH, NADPH o ninguno), en el número de subunidades involucradas (hasta tres) y si algunos o todos los dominios están o no fusionados entre sí. Otra manera de

diferenciarlos es a partir de su solubilidad, mientras que las CYPs eucariontes son transmembranales, sus contrapartes bacterianos son solubles. Un ejemplo de CYP soluble de origen bacteriano es la CYP P450 102A1.

1.1.2 Citocromo P450 102A1 (P450_{BM3}).

Es una CYP fusionada con subunidades redox P450_{BM3} de *Bacillus megaterium* (CYP102A1) es autosuficiente, soluble y tiene la capacidad de hidroxilar ácidos grasos. Esta es considerada como un flavocitocromo por que tiene la particularidad de tener en la misma cadena polipeptídica el dominio reductasa FMN/FAD y solo depende de sus cofactores, NADPH y oxígeno para funcionar. Los dos dominios que contienen los cofactores FMN y FAD unidos mediante un dominio puente, componen el núcleo de la actividad reductasa NADPH (CPR). El dominio FMN de la CPR es el encargado de mediar la transferencia de electrones desde el dominio FAD hasta el dominio oxidasa. Unidos, el dominio CPR y el dominio oxidasa, participan en el metabolismo de compuestos endógenos y xenobióticos en mamíferos (Aigrain et al., 2009).

Hasta el momento no hay una estructura publicada de todas las subunidades de la CYP, sin embargo, Ritter et al. (2015) generaron un modelo potencial de CYP mediante el alineamiento de la P450 con un homólogo del dominio FMN (Fig. 1). Juntos, el dominio oxidasa y los subdominios FMN/FAD tienen un peso de 119 kDa.

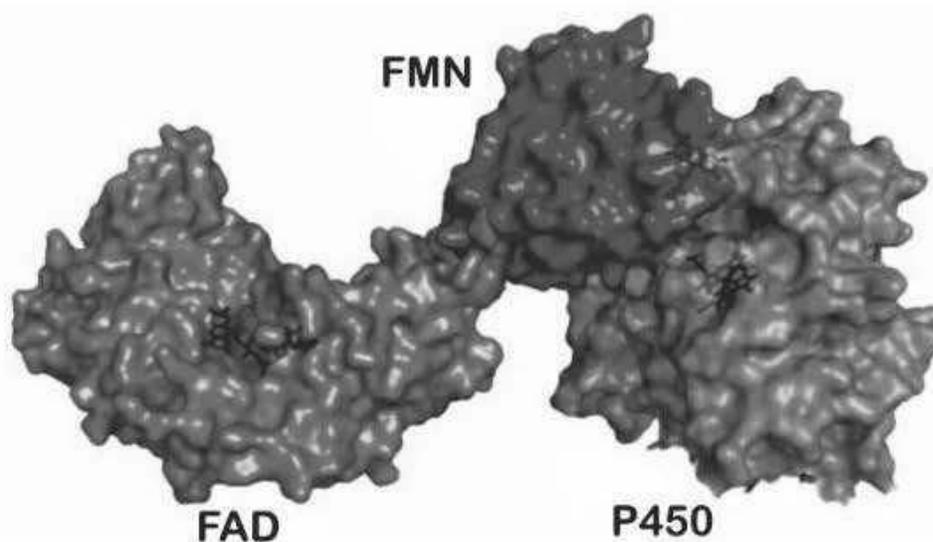


Figura 1. Modelo estructural de los tres subdominios de la CYP. El P450 y la subunidad FMN de BM3 (verde y morado, respectivamente; PDB-ID 1BVY) fueron alineados con un subdominio FAD de la reductasa NADPH de CYP P450 de una levadura (Azul, PDB-ID 3FJO) (Imagen tomada de Ritter, 2015).

Debido a que las CYP tienen la capacidad natural de transformar una gran variedad de compuestos exógenos, la industria farmacéutica ha prestado particular interés en desarrollar profármacos quimioterapéuticos que puedan ser transformados por dichas enzimas.

1.1.3 Terapia enzimática de activación de profármacos.

En esta terapia se utilizan enzimas para transformar un profármaco en una especie química con potencial efecto anticancerígeno. Este proceso se lleva a cabo en dos pasos, en el primer paso la enzima debe ser entregada a las células tumorales y como segundo paso se administra un profármaco (de manera dirigida o sistémica), el cual es el sustrato de la enzima exógena, transformándose selectivamente en las células cancerígenas blanco (Xu & Mcleod, 2001).

La terapia enzimática basada en anticuerpos, conocida como ADEPT (del inglés *antibody-directed enzyme prodrug therapy*) ha sido propuesta y consiste en dirigir la enzima a células blanco mediante la conjugación con un anticuerpo, el cual se une a antígenos que se encuentran en la superficie de las células tumorales. Otro método propuesto es la terapia génica, conocida como GDEPT (del inglés *gene-directed enzyme prodrug therapy*). Esta terapia consiste en el suministro de genes que codifican para enzimas con capacidad de transformar profármacos a las células tumorales. Estos genes han sido suministrados utilizando diferentes vectores, entre los que se encuentran los virales (Xu & Mcleod, 2001). Ninguna de las terapias génicas anteriores ha sido desarrollada a nivel clínico y menos aún a nivel comercial.

1.1.4 Partículas tipo virus (VLPs).

En un principio las VLPs fueron ampliamente exploradas en terapia génica para tratamientos contra la leucemia, gliomas, enfermedad de Parkinson y artritis, puesto que cuentan con estructuras altamente simétricas con un espacio en su interior el cual tiene la capacidad natural de albergar ácidos nucleicos, protegiendo la molécula de las condiciones ambientales (Blanco, Shen, & Ferrari, 2015). También se han utilizado para encapsidar metales, polímeros, fármacos, enzimas y proteínas. Uno de los primeros modelos para la encapsidación con VLPs corresponde al de la proteína verde fluorescente (GFP), la que se ha logrado fijar dentro de la cápside del virus del moteado clorótico del frijol caupí (CCMV) y la cápside

del bacteriófago P22 (Frederik Rurup et al., 2014; Minten, Nolte, & Cornelissen, 2010) y de esta manera, estudiar la cantidad de proteína que se puede encapsidar y el efecto del pH, que parece ser un factor importante en la integridad de la cápside.

La encapsidación de proteínas dentro de vehículos de origen viral, ofrece una serie de ventajas sobre las limitantes que presentan las proteínas como agentes terapéuticos. En un trabajo publicado en el 2013, O'Neil y colaboradores encapsidaron la enzima fosfotriesterasa (PTE) con la cápside del bacteriófago P22 y se observó que se mejoró la tolerancia térmica puesto que se mantuvo el 50% de la actividad a 60°C y se observó que en presencia de tripsina la enzima mantenía el 91% de la actividad enzimática. Estos resultados demostraron que la encapsidación de proteínas en partículas tipo virus aumenta la estabilidad térmica y provee de protección a la proteólisis. Otra ventaja que presentan las partículas de tipo viral es que poseen tamaño nanométrico, lo que las hace deseables para su uso en quimioterapia, pues se pueden acumular en tumores sólidos debido a un mecanismo conocido como efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR effect). Este efecto se caracteriza por un aumento de la permeabilidad del tejido endotelial de los vasos sanguíneos, lo que les permite a las partículas de tamaños nanométricos (100-500 nm) extravasarse y acumularse en los tumores; mientras que la deficiencia de drenaje linfático en el tejido les permite permanecer allí (Matsumura & Maeda, 1986; Torchilin, 2011).

1.1.5 Bacteriófago P22.

El bacteriófago P22 es un virus de doble cadena de ADN que infecta a *Salmonella typhimurium*, el cual se forma mediante el ensamblado de 415 proteínas de capa (CP) (producto del gen *gp5*) con 60-300 moléculas de proteína de andamiaje (SP) (producto del gen *gp8*), así como de proteínas de inyección y de portal para así formar una coraza de 58 nm de diámetro. La proteína de capa consta de 430 aminoácidos (46.7 kDa, monómero) (Figura 2A) la cual se asocia a otras formando 72 capsómeros de los cuales doce son pentámeros y 60 son hexámeros (Figura 2B) que en conjunto forman lo que se conoce como procápside (Figura 2C) (Teschke & Parent, 2010).

La partícula tipo virus derivada de la procápside del P22 solo requiere de la proteína de cápside y de andamiaje para ensamblarse. En un artículo publicado en el 2012 Zlotnick y colaboradores ensamblaron *in vitro* procapsides del bacteriófago P22 y concluyeron que si no hay proteína de andamiaje, la proteína de capa se ensambla de manera aberrante y la SP contribuye a la estabilidad de manera que se favorece

energéticamente la forma procapside, además resaltaron que hay múltiples sitios de unión de la SP (Zlotnick, Suhanovsky, & Teschke, 2012). Es por esto que para poder desarrollar partículas tipo virus del bacteriófago P22 con una enzima en su interior es indispensable fusionarla genéticamente con la proteína de andamiaje.

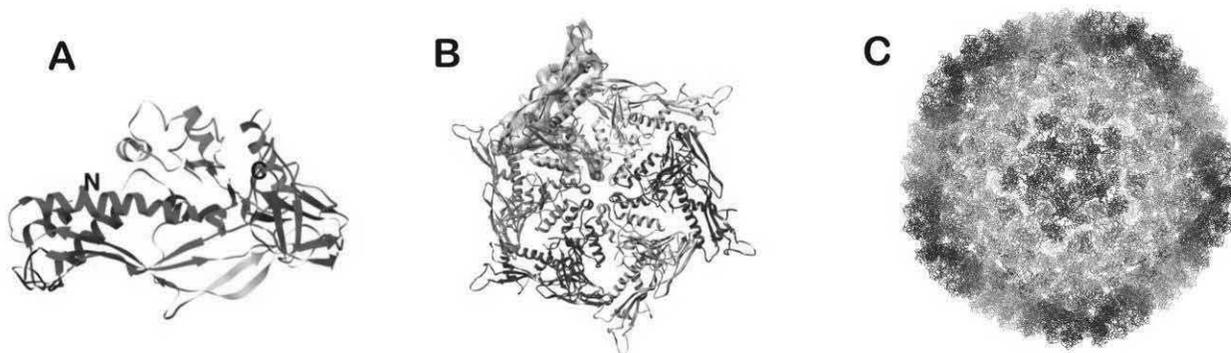


Figura 2. Estructura de la cápside del bacteriófago P22. A) Monómero de la proteína de capa (CP). B) Estructura de los hexámeros del P22. C) Cryoreconstrucción de la procápside del P22 (Modificado de Parent et al. 2010)

1.1.6 Encapsidación de enzimas.

El primer artículo que reportó la encapsidación de enzimas en partículas virales fue en el 2007, donde Comellas-Aragonès y colaboradores diseñaron un sistema para estudiar enzimas de manera individual en cápsides virales. En este trabajo se encapsidó la peroxidasa de rábano blanco en proteínas estructurales del CCMV, donde se estableció una relación entre el tiempo de difusión del sustrato y el pH al cual son sometidas las cápsides (Comellas-Aragonès et al., 2007). Posterior a dicho trabajo se encapsidaron diferentes enzimas en varios tipos de VLPs (Tabla 1). Aunque en algunos casos se presentó disminución de la actividad de la enzima, se generaron sistemas con propiedades catalíticas distintas a las de la enzima sin encapsidar, como aumento en la termoestabilidad y resistencia a proteólisis (Fiedler, Brown, Lau, & Finn, 2010; O'Neil et al., 2013).

Tabla 1. Encapsidación de múltiples enzimas en VLPs.

Enzima	Cápside	Enzimas por cápside	$k_{cat} K_M^{-1}$ Respecto a E_{libre}	Ref.
Citosina desaminasa	SV40	ND	Menor (VNR)	Inoue, 2008
Peptidasa E	Bacteriófago Q β	2-18	Menor 3X (9 enzimas)	Fiedler, 2010
Luciferasa	Bacteriófago Q β	4-8	Menor 30X (4 enzimas)	Fiedler, 2010
Pseudozima antártica lipasa B	CCMV	1-4	Mayor (K_{cat})	Minten, 2011
Fosfatasa alcalina	Bacteriófago MS2	3.2 (monómeros)	Igual	Glasgow, 2012
Alcohol deshidrogenasa	Bacteriófago P22	249 \pm 13	Menor 1.6X	Patterson, 2012a
CelB glucosidasa	Bacteriófago P22	87 \pm 3 (monómeros)	Igual	Patterson, 2012b
Fosfotriesterasa	Bacteriófago P22	40 \pm 10 (monómeros)	Menor 600X	O'Neil, 2013
Citocromo P450	CCMV	14	Menor 10X	Sánchez-Sánchez, 2014
Citocromo P450	Bacteriófago P22	110	Igual	Sánchez-Sánchez, 2015

ND: No determinado. VNR: Valor no reportado (Koyani, Pérez-Robles, Cadena-Nava, & Vazquez-Duhalt, 2017).

1.1.7 Encapsidación de CYP.

En un trabajo publicado en el 2014, Sánchez-Sánchez y colaboradores, se encapsidó el dominio hemo de la CYP dependiente de peróxido en VLPs del CCMV logrando obtener bionanorreactores biocatalíticamente activos para la transformación de los profármacos tamoxifeno y resveratrol. Posteriormente, en el 2015 se encapsidó el dominio hemo de la CYP en partículas tipo virus del bacteriófago P22, donde se observó una mayor capacidad de carga de enzima con respecto al trabajo publicado por Sánchez-Sánchez en el 2014 y una mayor estabilidad ante la degradación de proteasas. Asimismo, se logró lipofectar los nanobiorreactores a células tumorales mediante lipofectamina. Además, se comprobó que es posible funcionalizar los nanobiorreactores para dirigirlos contra los receptores de folato presentes en células de cáncer de mama, manteniendo la actividad a pesar de la modificación de las cápsides, logrando la muerte celular con bajas dosis del profármaco tamoxifeno. Sin embargo, la actividad catalítica de esta variante del dominio hemo de la CYP es dependiente de peróxido de hidrógeno, por lo que esto representa una desventaja al momento de realizar ensayos *in vivo* ante la imposibilidad de suministrar peróxido a los organismos.

Debido a lo anterior, el presente trabajo propone generar partículas virales con actividad citocromo P450 dependiente de NADPH para la activación de un profármaco con efectos quimioterapéuticos.

1.2 Justificación

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad en el mundo. La OMS reportó, tan solo en el 2012, 14 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes relacionadas con cáncer. Para atender este problema se utiliza principalmente la quimioterapia en la cual se administra un químico con efectos citotóxicos. Estos compuestos son generalmente administrados como profármacos y deben ser transformados o activados por las enzimas citocromo P450 (CYP) para convertirlos en el medicamento activo. En ciertos casos, el problema con esta terapia es que existe una baja expresión de CYP en las células tumorales con respecto a las células sanas, por lo tanto, cuando se administra el profármaco, este se activa preferentemente en tejido sano y ahí ejerce su efecto citotóxico. Otro problema es que dependiendo de donde se encuentre el tumor, varía la actividad de la CYP. Ya que estos profármacos al ser administrados vía oral pasan primero por el hígado donde se expresan la mayoría de las CYPs, por lo tanto, la mayoría de los profármacos son activados en este órgano, lo cual recae en una toxicidad sistémica procedente de una

terapia inespecífica. Esto conduce a tratamientos médicos a ensayo y error, lo cual representa un problema para la medicina. La terapia enzimática de activación de profármacos es una estrategia propuesta para aumentar la eficiencia de procedimientos médicos específicamente la quimioterapia. Con este proyecto no se pretende controlar el suministro de medicamentos sino controlar el suministro de actividad enzimática, lo cual se va a realizar generando nanopartículas tipo virus (VLPs) con CYP en su interior, para llevar la actividad enzimática a donde se necesite e incrementarla, para que el profármaco se active preferentemente en el tumor y no en células sanas.

1.3 Hipótesis

El citocromo P450 de *Bacillus megaterium* conteniendo los dominios hemo, FAD y FMN encapsulado en cápsides del bacteriófago P22 será activo en presencia de NADPH y tendrá la capacidad de transformar el profármaco tamoxifeno.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Diseñar, producir y caracterizar nanopartículas virales del bacteriófago P22 con actividad citocromo P450 con NADPH como fuente de electrones, para su potencial uso en la activación de profármacos en células cancerosas.

1.4.2 Objetivos específicos

- Diseño de estrategias para la obtención de la proteína de fusión CYP-proteína de andamiaje.
- Diseño de la expresión secuencial de partículas virales (VLPs) del bacteriófago P22 que contengan el citocromo P450 (CYP) en su interior en *E. coli*.
- Determinación de la capacidad catalítica de las VLPs en la transformación de sustratos específicos.

Capítulo 2. Metodología

PLÁSMIDOS (Anexo 1)

- **pBAD CYP-SP** (Resistencia a ampicilina, promotor de operón *araBAD*, inducible por arabinosa, contiene el gen que codifica para el citocromo de *Bacillus megaterium* "21B3" fusionado a la SP₁₄₁₋₃₀₃, un fragmento de la proteína de andamiaje del bacteriófago P22).
- **pRSF CP P22** (Resistencia a kanamicina, promotor *T7*, inducible por IPTG, contiene el gen que codifica para la proteína de la cápside del bacteriófago P22).
- **pBAD/His C** (Resistencia a ampicilina, promotor de *araC*, inducible por arabinosa).
- **pRSFDuet-1-BM3-TFFIS** (Resistencia a kanamicina, promotor *T7*, inducible por IPTG, contiene el gen que codifica para la CYP_{BM3} completa, contiene las mutaciones R47T/S72F/A82F/F87I/L437S).
- **pRSFDuet-1-BM3-WMV** (Resistencia a kanamicina, promotor *T7*, inducible por IPTG, gen que codifica para la CYP_{BM3} completa, contiene las mutaciones R47W/A82M/F87V).

2.1 Construcción de los plásmidos pBAD CYP_{TFFIS} y pBAD CYP_{WMV}.

2.1.1 Amplificación CYP_{TFFIS}, CYP_{WMV} y SP.

Las secuencias que codifican para las variantes de la CYP completa (TFFIS y WMV) y la proteína de andamiaje (SP) fueron amplificadas a partir de los plásmidos pRSFDuet-1-BM3-WMV, pRSFDuet-1-BM3-TFFIS y pBAD CYP-SP respectivamente mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para cada clonación se diseñaron oligonucleótidos, los cuales incluyen sitios de corte para las enzimas de restricción *NcoI*, *XhoI* y *EcoRI* (Tabla 2).

Tabla 2. Oligonucleótidos para la amplificación por PCR de las CYP's y la SP.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Sitio
CYPCompIFw	GATATACCATGGCAATTAAGAAATGCC	<i>NcoI</i>
CYPCompIRv	TGCTACTCGAGCCCAGCCCACACGTCTTTTGC	<i>XhoI</i>
SPFw	ATATCTCGAGCTGGTGCCGCGGCGCAG	<i>XhoI</i>
SPRv	GCTTCGAATTCATATGGTACC	<i>EcoRI</i>

Las reacciones de PCR (50 μ L) estuvieron conformadas por la solución CloneAmp™ HiFi PCR Premix 2X (Clonotech) (25 μ L), cada nucleótido (0.8 μ M), el par de oligonucleótidos (1.6 μ M) y los plásmidos utilizados como templado. Las condiciones de amplificación para cada ciclo térmico de las CYP's y la SP se describen en la Tabla 3. Los productos de PCR fueron purificados mediante el kit GenElute™ PCR Clean-up (Sigma-Aldrich, USA) y evaluados por electroforesis en geles de agarosa al 1% y fotodocumentados.

Tabla 3. Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa.

Paso	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min	1
Desnaturalización	95	30 s	
Alineamiento	55	30 s	35
Extensión CYP	72	3.5 min	
Extensión SP	72	30 s	
Extensión Final	72	10 min	1

2.1.2 Digestión de los productos CYP_{TFIS} y CYP_{WMV} y el plásmido pBAD/His C.

Los productos de PCR purificados (CYP_{TFIS} y CYP_{WMV}) y el plásmido pBAD/His C fueron digeridos empleando las enzimas de restricción *Nco*I y *Xho*I (New England Biolabs). Los fragmentos fueron digeridos mediante una reacción de 30 μ L que contenían solución tampón de enzima de restricción Cutsmart (1X), las enzimas de restricción (10 U) y cada fragmento (2.2 μ g). El plásmido pBAD/His C fue digerido mediante una reacción de 100 μ L que contenía una solución tampón de la enzima Cutsmart (1X), las enzimas de restricción (20 U) y el plásmido (5.6 μ g). Las reacciones de digestión se incubaron a 37 $^{\circ}$ C durante 4 h. Una vez concluida, los productos de la digestión de los fragmentos fueron purificados con el kit "Gen Elute PCR Clean-Up" (Sigma-Aldrich, USA) recuperándolos en 50 μ L de agua destilada estéril. El producto de digestión del vector pBAD/His C fue aislado mediante corte de banda en gel de agarosa (1%) y purificado con el kit "Gen Elute Gel Extraction" (Sigma-Aldrich, USA) y recuperando en 60 μ L de agua destilada estéril. Todos los productos de purificación fueron evaluados en gel de agarosa (1%) y cuantificados por espectrofotometría.

2.1.3 Ligación del vector pBAD/His C con los fragmentos CYP_{TFIS} y CYP_{WMV}.

La ligación de los productos de digestión CYP_{TFIS}, CYP_{WMV} y pBAD/His C se llevó a cabo mediante la enzima T4 DNA ligasa (Promega). Se llevaron a cabo dos reacciones de ligación diferentes, una para unir el fragmento CYP_{TFIS} con el vector pBAD/His C y la otra para unir el fragmento CYP_{WMV} con el vector pBAD/His C, para de esta manera dar lugar a dos vectores distintos a los cuales se les nombró pBAD CYP_{TFIS} y pBAD CYP_{WMV}. Los componentes de la reacción fueron: solución tampón de ligación 1X, T4 DNA ligasa (1 U) (Promega), vector digerido (~13 ng) e inserto (~35 ng) (relación molar 1:1 (vector:inserto)) en un volumen final de 20 μ L. La reacción se llevó a cabo a 16 °C durante 16 h.

El producto de la ligación fue utilizado para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α mediante choque térmico. Para lo cual 10 μ L de la reacción de ligación, 50 μ L de KCM y 50 μ L de células quimiocompetentes se mezclaron e incubaron en hielo por 30 min, 42 °C por 2 min y en hielo nuevamente por 2 min. Posteriormente las células fueron recuperadas con 1 mL de medio SOC en un tubo Eppendorf de 1.5 mL e incubadas durante 2 h con agitación constante (180 rpm) a 37 °C. Finalmente se sembraron en placas Petri con medio LB sólido adicionado con ampicilina 200 mg/mL y se incubaron a 37 °C por 18 h.

Las colonias obtenidas fueron resemebradas en el mismo medio selectivo y se utilizaron para hacer PCR de colonia utilizando los oligonucleótidos específicos CYPCompIFw y CYPCompIRv (Tabla 3) para corroborar la presencia de los fragmentos CYP_{TFIS} y CYP_{WMV}. La reacción de PCR (25 μ L) estuvo conformada por una solución tampón TaqGo 1X, MgCl₂ (2mM), dNTPs (0.15 mM), Taq DNA polimerasa, el par de oligonucleótidos (0.6mM) y la colonia como templado. Las condiciones de la amplificación para cada ciclo se describen en la Tabla 3. Los productos de PCR fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa (1%) y fotodocumentados. De las clonas que mostraron tener el inserto se seleccionaron dos para la variante CYP_{TFIS} y dos para la variante CYP_{WMV}, las cuales se cultivaron en 6 mL de medio LB y se incubaron a 37 °C por 18 h con agitación constante (180 rpm) para posteriormente criopreservarlas y purificar plásmido mediante el kit "QIAprep Spin Miniprep" recuperándolos en 50 μ L de agua destilada estéril. Estos fueron evaluados por electroforesis en geles de agarosa (1%) y fotodocumentados.

2.2 Construcción de los plásmidos pBAD CYP_{TFIS}-SP y CYP_{WMV}-SP.

2.2.1 Digestión del fragmento SP y los plásmidos pBAD CYP_{TFIS} y pBAD CYP_{WMV}.

El fragmento purificado (SP) y los plásmidos pBAD CYP_{TFIS} y pBAD CYP_{WMV} fueron digeridos empleando las enzimas de restricción *XhoI* (New England Biolabs) y *EcoRI* (Thermo Fisher Scientific). El fragmento fue digerido mediante una reacción de 30 μ L que contenía solución tampón única de la enzima *EcoRI* (1X), las enzimas de restricción (10 U) y el fragmento SP (423 ng). Los plásmidos pBAD CYP_{TFIS} y pBAD CYP_{WMV} fueron digeridos mediante una reacción de 100 μ L que contenía una solución tampón única de la enzima *EcoRI* (1X), las enzimas de restricción (20 U) y el plásmido (5.6 μ g). Las reacciones de digestión se incubaron a 37 °C durante 4 h. Una vez concluida, los productos de la digestión de los fragmentos fueron purificados con el kit "Gen Elute PCR Clean-Up" (Sigma-Aldrich, USA) recuperándolos en 50 μ L de agua destilada estéril. Los productos de digestión de los vectores pBAD CYP_{TFIS} y pBAD CYP_{WMV} fueron aislados mediante corte de banda en gel de agarosa (1%) y purificados con el kit "Gen Elute Gel Extraction" (Sigma-Aldrich, USA) recuperándolo en 60 μ L de agua destilada estéril. Todos los productos de purificación fueron evaluados en gel de agarosa (1%) y cuantificados por espectrofotometría.

2.2.2 Ligación de los plásmidos pBAD CYP_{TFIS} y pBAD CYP_{WMV} con la SP.

La ligación de los productos de digestión SP, pBAD CYP_{TFIS} y pBAD CYP_{WMV} se llevó a cabo mediante la enzima T4 DNA ligasa (Promega). Se llevaron a cabo dos reacciones de ligación, en la primera se unió el fragmento SP con el vector pBAD CYP_{TFIS} y en la segunda se unió el fragmento SP con el vector pBAD CYP_{WMV}, para de esta manera dar lugar a dos vectores distintos a los cuales se les nombró pBAD CYP_{TFIS}-SP y pBAD CYP_{WMV}-SP. Los componentes de la reacción fueron: solución tampón de ligación 1X, T4 DNA ligasa (1 U) (Promega), vector digerido (22 ng) e inserto (10 ng) (relación molar 1:1 (vector:inserto)) en un volumen final de 20 μ L. La reacción se llevó a cabo a 16 °C durante 16 h.

El producto de la ligación fue utilizado para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α mediante choque térmico. Para lo cual 10 μ L de la reacción de ligación, 50 μ L de KCM y 50 μ L de células quimiocompetentes se mezclaron e incubaron en hielo por 30 min, 42 °C por 2 min y en hielo nuevamente por 2 min. Posteriormente las células fueron recuperadas con 1 mL de medio SOC en un tubo Eppendorf

de 1.5 mL e incubadas durante 2 h con agitación constante (180 rpm) a 37 °C. Finalmente se sembraron en placas Petri con medio LB sólido adicionado con ampicilina 200 mg/mL y se incubaron a 37 °C por 18 h.

Las colonias obtenidas fueron resembradas en el mismo medio selectivo y se utilizaron para hacer PCR de colonia utilizando los oligonucleótidos específicos SPFw y SPRv (Tabla 3) para corroborar la presencia del fragmento SP en ambos vectores. La reacción de PCR (25 µL) estuvo conformada por una solución tampón TaqGo 1X, MgCl₂ (2mM), dNTPs (0.15 mM), Taq DNA polimerasa, el par de oligonucleótidos (0.6 mM) y la colonia como templado. Las condiciones de la amplificación para cada ciclo se describen en la Tabla 3. Los productos de PCR fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa (1%) y fotodocumentados. De las clonas que mostraron tener el inserto se seleccionó una para la variante CYP_{TFIS} y cuatro para la variante CYP_{WMV}, las cuales se cultivaron en 6 mL de medio LB y se incubaron a 37 °C por 18 h con agitación constante (180 rpm) para posteriormente criopreservarlas y purificar plásmido mediante el kit “QIAprep Spin Miniprep” recuperándolos en 50 µL de agua destilada estéril. Todos los productos de purificación fueron evaluados en gel de agarosa (1%) y fotodocumentados.

A partir de los plásmidos con el inserto correctamente clonado, se eligió uno de cada construcción para transformar células *E. coli* (DE3) electrocompetentes para su expresión. La transformación se llevó a cabo mediante un electroporador EasyJect Prima (EquiBio), para lo cual se utilizaron 5 µL de los plásmidos purificados (~500 ng) que codifican para las proteínas de fusión (pBAD CYP_{TFIS}-SP y pBAD CYP_{WMV}-SP) y 1.5 µL del plásmido purificado pRSF CP P22 (~500 ng), los cuales se mezclaron con 100 µL de células electrocompetentes y se transfirieron a una celda para electroporar (2 mm) donde se les dio un pulso de 2.5 kV para transformar las bacterias. Posteriormente las células fueron recuperadas en 1 mL de medio LB en un tubo Eppendorf e incubadas durante 1.5 h con agitación constante (180 rpm) a 37 °C. Finalmente 100 µL del cultivo se sembraron en placas Petri con medio LB sólido con ampicilina (200 mg/mL) y kanamicina (30 mg/mL) y se incubaron a 37 °C por 18 hrs.

De las clonas obtenidas por electroporación se eligieron dos de cada una de las variantes de proteína de fusión para criopreservarlas y posteriormente realizar inducción de la expresión de las proteínas. Las clonas resultantes fueron nombradas: BL21(DE3)-pBAD CYP_{WMV}-SP¹, BL21(DE3)-pBAD CYP_{WMV}-SP², BL21(DE3)-pBAD CYP_{TFIS}-SP¹ y BL21(DE3)-pBAD CYP_{TFIS}-SP².

2.3 Expresión secuencial de CYP_{WMV}-SP, CYP_{TFIS}-SP y CP P22.

Con el propósito de saber si las dos proteínas de fusión (CYP_{TFIS}-SP y CYP_{WMV}-SP) y la proteína de cápside del bacteriófago P22 (CP P22) se sobreexpresaban en cada clona, se realizó una selección para obtener las clonas que fueran inducibles por IPTG y L-arabinosa, corroborado mediante la separación de las proteínas en un gel SDS-PAGE al 10%, que se corrió a 200 volts y se tiñó con InstantBlue (Expedeon, Cambridge, UK).

Una vez seleccionadas las clonas, se realizó la expresión de las proteínas CYP_{WMV}-SP y CYP_{TFIS}-SP y posteriormente la expresión de la proteína de la cápside CP. La expresión secuencial se inició utilizando un precultivo de una clona de cada variante de CYP. Se siguieron dos esquemas con distintos tiempos de inducción para la proteína CYP-SP. Para el primero de ellos, se tomó 1 mL del precultivo de la cepa transformada para inocular cada cultivo de 100 mL de medio TB (Terrific Broth) con Amp²⁰⁰ y Km³⁰ adicionado con 0.5 mM de tiamina y elementos traza. Se dejó crecer a 30°C y 180 rpm hasta alcanzar una OD₆₀₀ = 0.8. Seguido se indujo la expresión de la CYP-SP con 0.125% de L-arabinosa y se añadió 1 mM de ácido amino-levulínico necesario para la síntesis del sitio activo de la enzima. Se dejó crecer el cultivo por 16 h a 30 °C y 180 rpm. Posteriormente se indujo la expresión de la CP adicionando 1 mM de IPTG y se crecieron los cultivos 4 h más a 30 °C y 180 rpm. Para el segundo esquema de expresión se modificó el tiempo de expresión de la CYP-SP a 5 h.

Al terminar la inducción, los cultivos se centrifugaron en frío a 3,840 g por 10 min, las células se re-suspendieron en amortiguador de lisis (50 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, pH 7.6) para posteriormente sonificar y centrifugar la muestra a 12,000 g por 30 min a 4°C y de esta manera recuperar el sobrenadante, el cual contiene las VLPs P22- CYP_{TFIS} y VLPs P22- CYP_{WMV}.

2.4 Purificación de las VLPs P22- CYP_{TFIS} y VLPs P22-CYP_{WMV}.

Una vez recuperado el sobrenadante (aproximadamente 50 mL por 200 mL de cultivo) proveniente de la lisis celular, se realizó la purificación de las cápsides P22 que contienen citocromo mediante ultracentrifugación utilizando un colchón de sacarosa al 35% (5 mL) preparado en amortiguador PBS (50 mM Na₂HPO₄, 25 mM NaCl, pH 7). La ultracentrifugación se llevó a cabo a 215,000 g (42,240 rpm) durante 1 h a 4°C utilizando un rotor de ángulo fijo 50.2 Ti Beckman Coulter, Inc. (Optima XPN-100 Ultracentrifuge,

Beckman Coulter). El sobrenadante fue eliminado y el pellet fue resuspendido en amortiguador PBS (aproximadamente 2 mL) utilizando agitación leve y constante.

Posteriormente la muestra se filtró utilizando un filtro de 22 μm para remover agregados y se cargó en una columna de filtración en gel HiPrep 16/60 Sephacryl S-500 HR (GE Healthcare) utilizando un flujo de 1 ml/min de solución amortiguadora PBS en el equipo ÄKTA prime plus (GE Healthcare). Las fracciones correspondientes a la elución de las cápsides correctamente ensambladas fueron colectadas alrededor de los 65 min y posteriormente concentradas por medio de ultracentrifugación a 215,000 g durante 1h a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 100 mM Tris-HCl pH 8 utilizando agitación leve y constante a 4°C.

Una vez resuspendidas las cápsides virales (VLPs P22-CYP_{TFIS} y VLPs P22-CYP_{WMV}) se analizaron mediante el microscopio electrónico de transmisión (TEM). Para esto se utilizó la técnica de tinción negativa, colocando las VLPs P22-CYP en una rejilla con cobre de 400 mesh, cubiertas con una película fina de carbón, durante dos minutos. Posteriormente, se retiró el exceso de la muestra con papel filtro y se realizó la tinción negativa con acetato de uranilo al 2% durante un minuto. Las observaciones fueron analizadas con un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-2010 (JEOL Ltd., Peabody, MA, USA).

2.5 Determinación de la concentración y actividad CYP de las VLPs P22-CYP_{TFIS} y VLPs P22-CYP_{WMV}.

La concentración de la enzima dentro de la cápside, molaridad de confinamiento se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$M_{conf} = \frac{(\text{Enzimas}_{por\ cápside}) \left(\frac{1\ mol}{6.022 \times 10^{23}\ \text{enzimas}} \right)}{\text{Volúmen interno}_{cápside}}$$

El volumen interno de la cápside del P22 es de 5.8×10^{-20} L ($58000\ \text{nm}^3$) con un $r_{interno} = 24\text{nm}$.

El porcentaje de ocupación de la cápside por la enzima se determinó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Ocupación} = \left(\frac{(\text{Enzimas}_{\text{por cápside}})(\text{Volúmen}_{\text{CYP}})}{\text{Volúmen interno}_{\text{cápside}}} \right) \times 100$$

El volumen de la CYP completa, 534.81 nm³, fue calculado a partir de su radio hidrodinámico (6.1 nm).

Se determinó la actividad de las cápsides P22 con CYP encapsidada utilizando como sustrato 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMF) (500 μM) con NADPH (0.06 μM) como fuente de electrones. La transformación de 2,6-DMF se monitoreo a 468 nm con un coeficiente de extinción de 49,600 M⁻¹ cm⁻¹ en el espectrofotómetro Agilent 8453 UV-VIS. Se realizó con control sin VLP's P22-CYP para cuantificar el consumo basal de NADPH, la pendiente resultante se restó a la de la actividad de las VLPs P22-CYP para determinar la actividad específica.

Capítulo 3. Resultados y Discusión

3.1 Construcción de los plásmidos pBAD CYP_{TFFIS}-SP y pBAD CYP_{wmv}-SP.

Los plásmidos pBAD CYP-SP, pRSF CP P22, pRSFDuet-1-BM3-WMV y pRSFDuet-1-BM3-TFFIS se electroporaron en 50 μ L de bacterias electrocompetentes MG 1655. Al final de 1 h de recuperación, se plaquearon 50 μ L de cada transformante en cajas de LB con el antibiótico correspondiente a la resistencia del plásmido (Amp²⁰⁰ ó Km³⁰) y fueron crecidas a 37 °C por 16 h. Posteriormente cada una de las transformantes fue recuperada en medio LB líquido para ser criopreservadas.

3.1.1 Purificación de plásmidos.

Los plásmidos pBAD CYP-SP, pBAD/His-C, pRSF CP P22, pRSFDuet-1-BM3-WMV y pRSFDuet-1-BM3-TFFIS fueron purificados de las células *E. coli* MG 1655 mediante lisis alcalina con el kit QIAprep Spin Miniprep. Posteriormente fueron analizados en un gel de agarosa (1%) (Fig. 3) para evaluar su integridad.

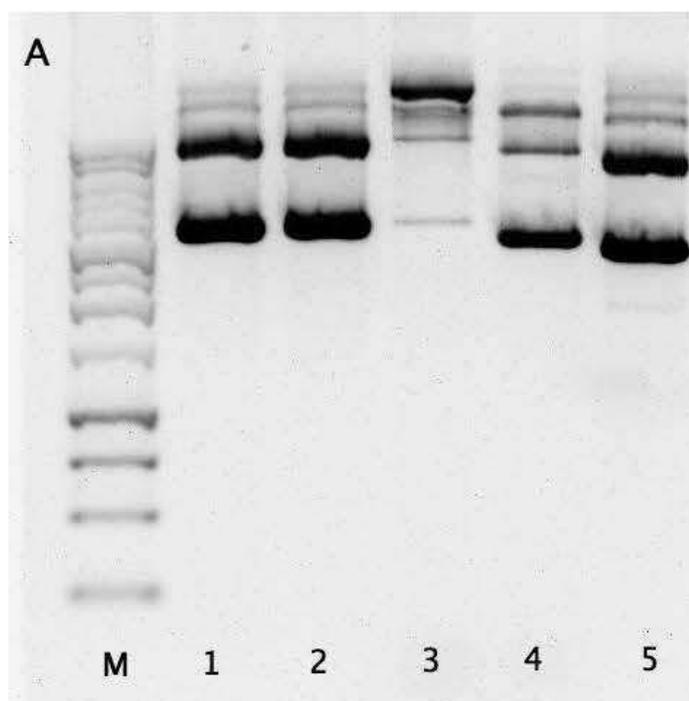


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los plásmidos purificados. Los carriles 1-5 corresponden a pBAD CYP-SP, pBAD/His-C, pRSF CP P22, pRSFDuet-1-BM3-WMV y pRSFDuet-1-BM3-TFFIS respectivamente. M=marcador de peso molecular 1kb (Promega).

Como se observa en la Tabla 4, se obtuvo una concentración alta de los diferentes plásmidos. El cálculo de la relación A260/A280, expresa la pureza de ADN. Sabiendo que las proteínas tienen un máximo de absorción a una $\lambda=280$ las lecturas a esta longitud pueden mostrar si existe algún contaminante proteico. Un valor de 1.8 a 2 indica una muestra pura, por lo tanto, podemos concluir que las muestras presentan una alta pureza.

Tabla 4. Cuantificación de los vectores pBAD CYP-SP, pRSF CP P22, pRSFDuet-1-BM3-WMV, pRSFDuet-1-BM3-TFFIS y pBAD/His C a 260 nm.

Plásmido	ng/ μ L	A260/A280
pBAD CYP-SP	85.8	1.96
pRSF CP P22	405.5	1.96
pRSFDuet-1-BM3-WMV	255.1	1.98
pRSFDuet-1-BM3-TFFIS	292.5	1.98
pBAD/His C	71	1.97

3.1.2 Amplificación de los fragmentos CYP_{TFFIS}, CYP_{WMV} y SP.

Como se observa en la electroforesis de la Fig. 4, el tamaño de los fragmentos de las variantes de la CYP_{BM3} completa (TFFIS y WMV) y la proteína de andamiaje (SP) amplificados por PCR a partir de los plásmidos pRSFDuet-1-BM3-WMV, pRSFDuet-1-BM3-TFFIS y pBAD CYP-SP, corresponden con el tamaño teórico esperado para cada fragmento, siendo 553 pb para la SP y 3147 pb para las CYP's. Se observa que en el caso de la SP hay inespecificidad de los oligonucleótidos por lo que será necesario cortar banda del gel de agarosa para posteriormente purificarla y asegurar la construcción correcta de la proteína de fusión CYP-SP.

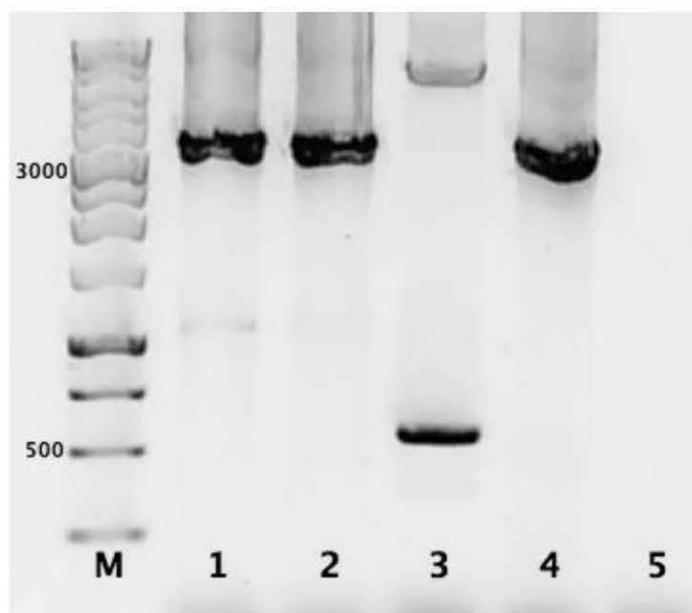


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR. En el carril 1 se encuentra la CYP_{BM3} TFFIS, en el 2 la CYP_{BM3} WMV, en el 3 la SP, en el 4 el control positivo y el 5 el control negativo. M=marcador de peso molecular 1kb (Promega).

3.1.3 Digestión doble de CYP_{TFFIS} , CYP_{WMV} y del plásmido pBAD/His C.

Se realizó la doble digestión del vector pBAD/His C y los fragmentos CYP_{TFFIS} y CYP_{WMV} utilizando las enzimas *NcoI* y *XhoI*. Los productos se purificaron y cuantificaron, obteniendo un rendimiento de recuperación de 39.3% para el vector pBAD/His C, 24.2% para CYP_{TFFIS} y 23.30% para CYP_{WMV} (Tabla 5). A pesar de la pérdida registrada, la cantidad de material purificado fue suficiente para proceder con la ligación de los mismos.

Tabla 5. Cuantificación del vector pBAD/His C y los fragmentos CYP_{TFFIS} y CYP_{WMV} purificados antes y después de la digestión.

	Sin digerir		Digerido	
	ng/ μ L	A260/A280	ng/ μ L	A260/A280
CYP_{TFFIS}	142.5	1.87	34.5	1.93
CYP_{WMV}	152.3	1.88	35.5	1.92
pBAD/His C	71	1.97	27.9	1.89

La electroforesis en gel de agarosa mostró la integridad de los productos de la digestión (Fig. 5). A partir de este análisis se determinó que la digestión del vector pBAD/His C fue completa puesto que no se observó la presencia de bandas adicionales correspondientes a los demás arreglos tridimensionales que puede adoptar el vector como en la versión sin digerir (Fig. 3). En ninguna de las muestras se observó indicios de degradación y además se conserva la pureza de las muestras.

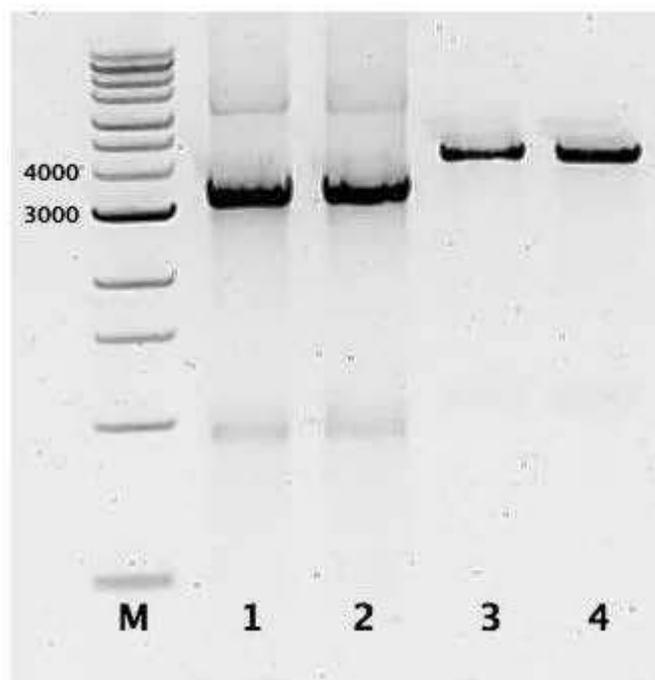


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de digestión (*NcoI* y *XhoI*) purificados. Se muestra en el carril 1 CYP_{TFRS}, 2 la CYP_{WMV} y en el 3 y 4 el vector pBAD/His C. M=marcador de peso molecular 1kb (Promega).

3.1.4 Ligación de los fragmentos CYP_{TFRS}, CYP_{WMV} con el plásmido pBAD/His C.

Con los productos de digestión se prepararon las reacciones de ligación correspondientes a las dos construcciones (pBAD CYP_{TFRS} y pBAD CYP_{WMV}) con las cuales se transformaron células *E. coli* DH5 α . Como resultado de la transformación se obtuvieron 20 colonias correspondientes a la construcción pBAD CYP_{TFRS} y 9 colonias correspondientes a la construcción pBAD CYP_{WMV}. Se realizó PCR de todas las colonias, pero solo cinco de la construcción pBAD CYP_{TFRS} y seis de la construcción pBAD CYP_{WMV} fueron evaluadas mediante gel de agarosa (1%). En la Fig. 6 se observa un fragmento alrededor de 3,000 pb, el cual corresponde

con el tamaño de las CYP's el cual es de 3,147 pb. Para el caso de la construcción pBAD CYP_{TFIS} solo una colonia no presento el fragmento del tamaño esperado, mientras que para para pBAD CYP_{WMV} todas las clonas analizadas presentaron el fragmento. Se seleccionaron dos clonas de cada construcción y se purifico plásmido mediante lisis alcalina.

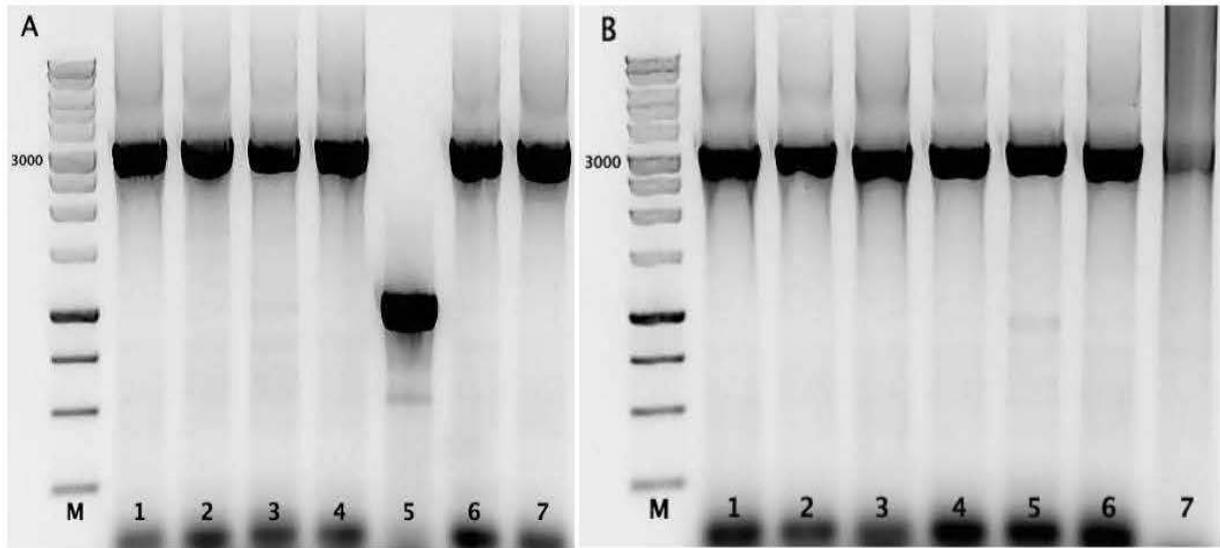


Figura 6. Análisis electroforético del PCR de colonia correspondiente a las dos construcciones. En los carriles 1 a 7 se muestran las cinco colonias evaluadas para la construcción pBAD CYP_{TFIS} (A). En los carriles 1 a 6 de muestran las seis colonias evaluadas para la construcción pBAD CYP_{WMV} (B). M=marcador de peso molecular 1kb (Promega).

La presencia de los fragmentos fue confirmada mediante PCR y digestión utilizando como template el plásmido obtenido de cada una de las clonas seleccionadas de ambas construcciones. A partir de este análisis se determinó que las clonas seleccionadas de cada construcción poseían el fragmento CYP. En el PCR (Fig. 7A) se puede observar un fragmento alrededor de 3,000 pb, correspondiente al tamaño de las CYP's de 3,147 pb. La doble digestión de los vectores (Fig. 7B) muestra tres bandas, una de ellas con el tamaño de la CYP, la segunda alrededor de 4,000 pb correspondiente al tamaño del vector sin el inserto y la banda de mayor tamaño es correspondiente a la digestión parcial del vector. Se seleccionó una clona de cada construcción para proceder a la ligación de la SP.

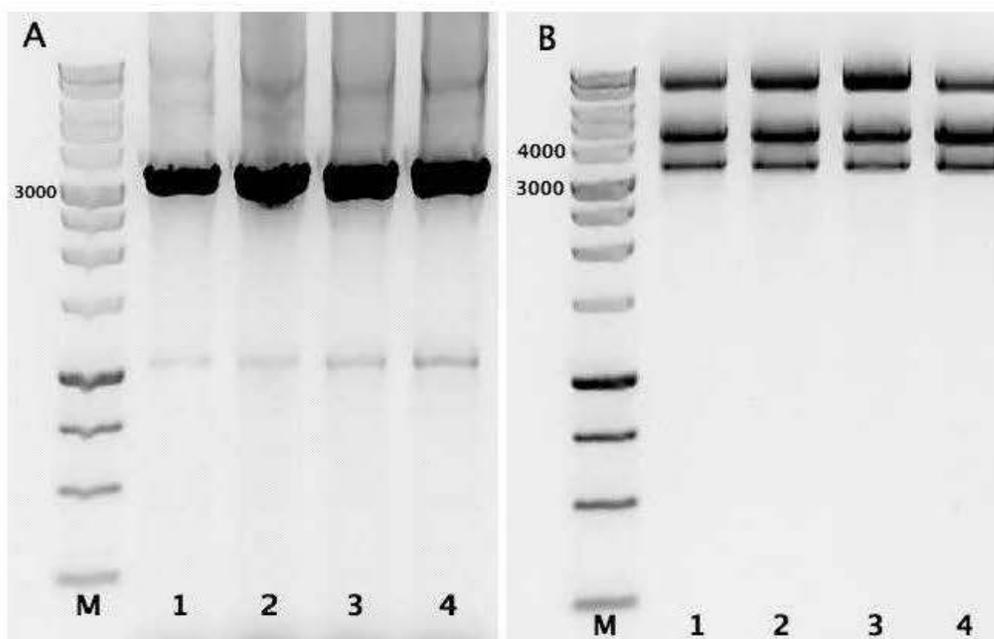


Figura 7. Análisis electroforético del PCR (A) y digestión doble (*NcoI* y *XhoI*) (B) de las construcciones pBAD CYP_{TFFIS} y pBAD CYP_{WMV}. En el carril 1 y 2 se encuentran las clonas 3 y 5 de la construcción pBAD CYP_{TFFIS} y en el carril 3 y 4 las clonas 22 y 23 de la construcción pBAD CYP_{WMV}. M=marcador de peso molecular 1kb (Promega).

3.1.5 Digestión doble de SP, pBAD CYP_{TFFIS} y pBAD CYP_{WMV}.

El producto de PCR del fragmento SP fue aislado mediante corte de banda en gel de agarosa (1%) debido a que había inespecificidad de los oligonucleótidos. Posterior al corte de banda, el fragmento fue purificado por columna.

Se realizó la digestión doble de los vectores pBAD CYP_{TFFIS} y pBAD CYP_{WMV} y el fragmento SP utilizando las enzimas de restricción *XhoI* y *EcoRI*, los productos se purificaron y cuantificaron, obteniendo un rendimiento de recuperación de 31.8% para el vector pBAD CYP_{TFFIS}, 24.2% para pBAD CYP_{WMV} y 35.4% para SP (Tabla 6). A pesar de la pérdida registrada, la cantidad de material purificado fue suficiente para proceder con la ligación de los mismos.

Tabla 6. Cuantificación de los vectores pBAD CYP_{TFEIS} y pBAD CYP_{WMV} y el fragmento SP purificados antes y después de la digestión.

	Sin digerir		Digerido	
	ng/ μ L	A260/A280	ng/ μ L	A260/A280
pBAD CYP _{TFEIS}	88.4	1.97	21.4	1.96
pBAD CYP _{WMV}	71.2	1.98	22.7	1.98
SP	28.2	1.89	10	1.94

La integridad de los productos de la digestión, evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa (Fig. 8), mostró que la digestión de los vectores pBAD CYP_{TFEIS} y pBAD CYP_{WMV} fue completa ya que no se observó la presencia de bandas adicionales correspondientes a los demás arreglos tridimensionales que puede adoptar el vector como en la versión sin digerir. En ninguna de las muestras se observó indicios de degradación.

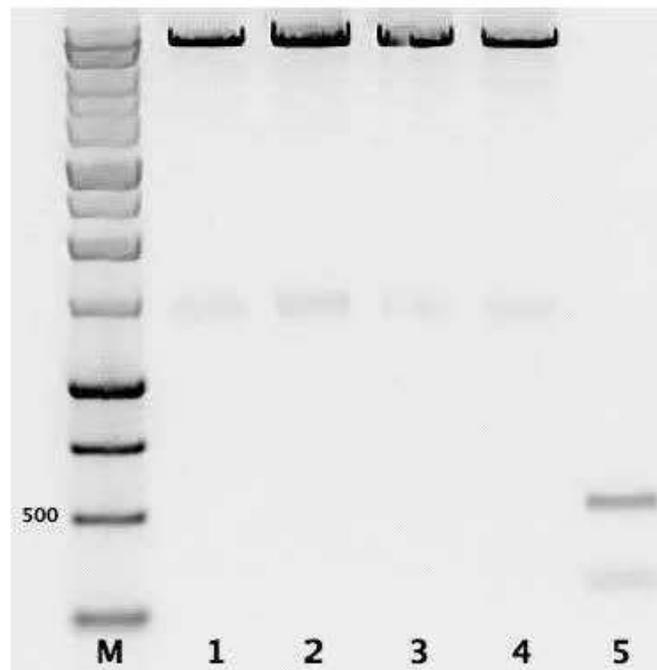


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de digestión (*Xho*I y *Eco*RI) purificados. Se muestra en el carril 1 y 2 pBAD CYP_{TFEIS}, en el 3 y 4 pBAD CYP_{WMV} y en el 5 se observa la SP. M=marcador de peso molecular 1kb (Promega).

3.1.6 Ligación del fragmento SP con los plásmidos pBAD CYP_{TFIS} y pBAD CYP_{WMV}.

Con los productos de digestión se prepararon las reacciones de ligación correspondientes a las dos construcciones (pBAD CYP_{TFIS}-SP y pBAD CYP_{WMV}-SP) con las cuales se transformaron células *E. coli* DH5 α . Como resultado de la transformación se obtuvieron 5 colonias correspondientes a la construcción pBAD CYP_{TFIS}-SP y 12 colonias correspondientes a la construcción pBAD CYP_{WMV}-SP. Se realizó PCR de todas las colonias y fueron evaluadas mediante gel de agarosa (1%), el tamaño de banda esperado para la SP fue de 553 pb (Fig. 9).

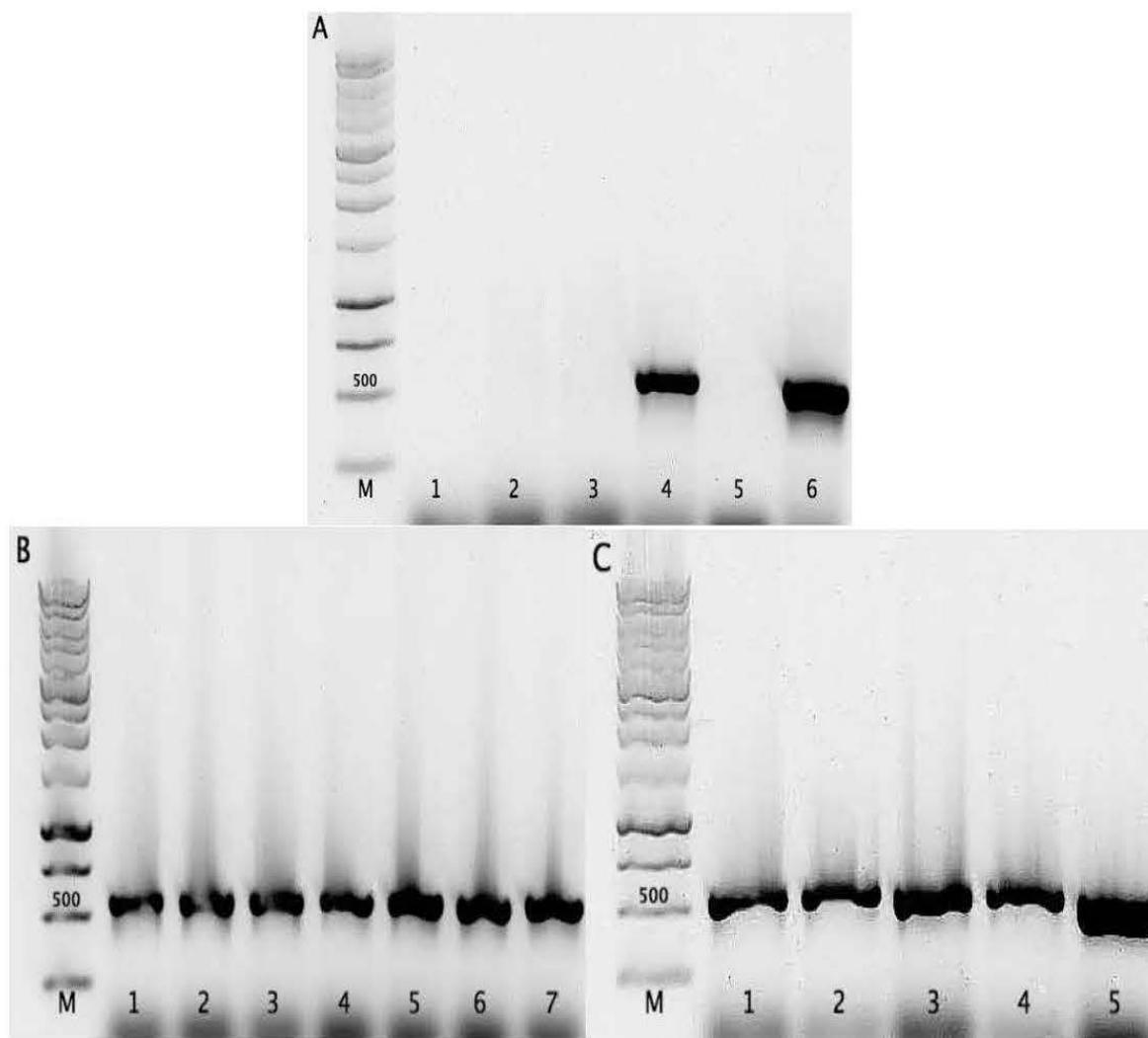


Figura 9. Análisis electroforético del PCR de colonia correspondiente a las construcciones pBAD CYP_{WMV}-SP y pBAD CYP_{TFIS}-SP. En los carriles 1 a 5 se muestran las cinco colonias evaluadas para la construcción pBAD CYP_{TFIS}-SP, en el carril 6 el control positivo (A). En todos los carriles se muestran las colonias evaluadas para la construcción pBAD CYP_{WMV}-SP (B) y (C). M=marcador de peso molecular 1kb (Promega).

Para el caso de la construcción pBAD CYP_{TFE}-SP solo una colonia presentó el fragmento del tamaño esperado, mientras que para para pBAD CYP_{WMV}-SP todas las clonas analizadas presentaron el fragmento esperado. Posteriormente se purifico plásmido de cada construcción mediante lisis alcalina.

La presencia del fragmento SP fue ratificada mediante PCR y digestión utilizando como templado el plásmido obtenido de cada una de las clonas seleccionadas de ambas construcciones, se puede observar que para ambos casos se obtiene el fragmento de la SP (Fig. 10).

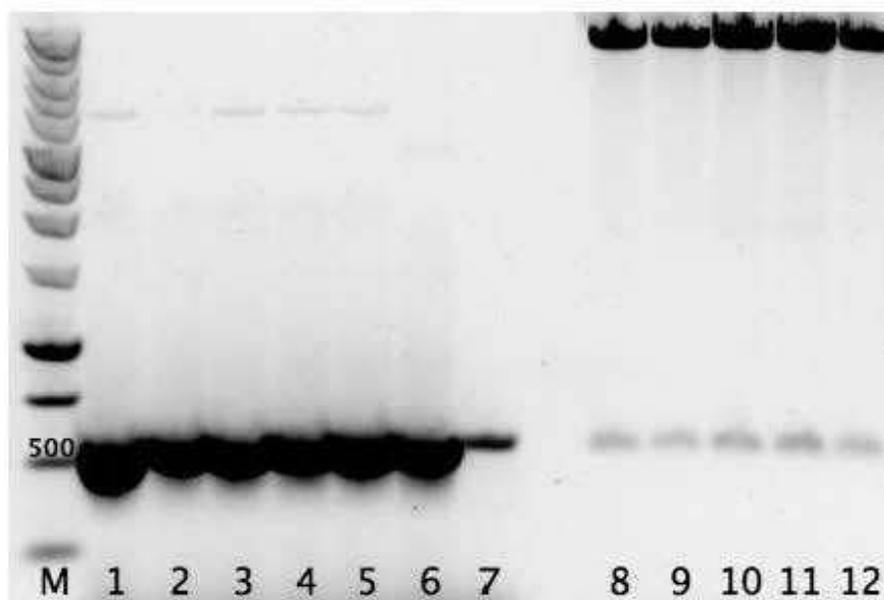


Figura 10. Análisis electroforético del PCR y digestión doble (*Xho*I y *Eco*RI) de las construcciones pBAD CYP_{TFE}-SP y pBAD CYP_{WMV}-SP. En el carril 1 a 4 y 8 a 12 se encuentran las clonas de la construcción pBAD CYP_{WMV}-SP, en el carril 5 y 13 las clonas de la construcción pBAD CYP_{TFE}-SP, los carriles 6 y 7 corresponden a controles positivos. M=marcador de peso molecular 1kb (Promega).

Por último, se realizaron dos reacciones de PCR para comprobar la presencia del fragmento de DNA correspondiente a la proteína de fusión CYP_{TFE}-SP y CYP_{WMV}-SP. En la primera reacción se utilizaron los oligonucleótidos para amplificar la CYP y en la segunda reacción se utilizó el oligonucleótido sentido de la CYP y el antisentido de la SP. Este análisis electroforético (Fig. 11) evidenció la presencia de una banda correspondiente al tamaño de la CYP-SP, por lo que se corrobora que las clonaciones fueron exitosas y es posible proceder al ensayo de expresión de las proteínas de fusión CYP_{TFE}-SP y CYP_{WMV}-SP.

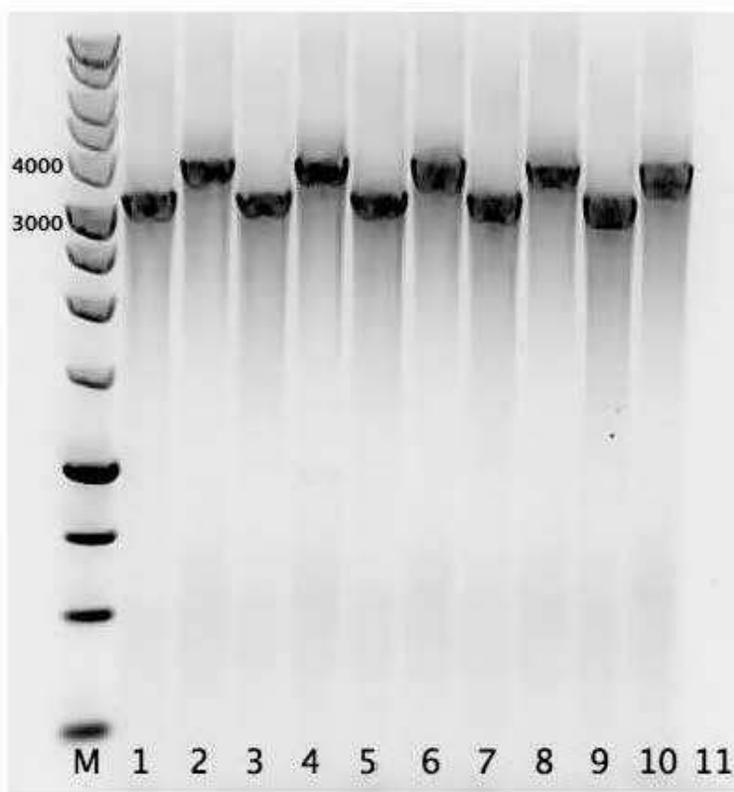


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR CYP y CYP-SP. En los carriles 1, 3, 5, 7 y 9 se encuentra la CYP, en los carriles 2, 4, 6, 8 y 10 se encuentra la CYP-SP y en el último carril se encuentra el control negativo. M=marcador de peso molecular 1kb (Prom ega).

3.2 Análisis de la expresión a pequeña escala de CYP-SP y CP.

Los plásmidos pBAD CYP_{TF15}-SP, pBAD CYP_{WMV}-SP y pRSF CP P22 se electroporaron en 50 μ L de bacterias electrocompetentes *E. coli* BL21 (DE3). Posteriormente se recuperó dos clones de cada una de las transformantes en medio LB líquido para criopreservarlas y realizar un ensayo de inducción de la expresión de ambas proteínas.

Para obtener las donas que sobreexpresarán las proteínas se tomaron 100 μ L de los cuatro pre-cultivos para inocular ocho tubos de 5 mL con medio fresco LB adicionado con ambas resistencias en dos

ensayos diferentes; el primer ensayo consistió en la adición de 0.125% de L-arabinosa para inducir la expresión de la proteína de fusión CYP-SP y el segundo ensayo consistió en agregar 0.3 mM de IPTG para la inducción de la expresión de la proteína de la cápside CP. La inducción se dejó por 5 h a 37 °C, posteriormente fueron analizadas mediante un gel de poliacrilamida al 10% el cual se tiñó con InstantBlue (Fig. 12). De acuerdo a este ensayo se observa que las cuatro clonas sobreexpresan tanto la proteína de fusión (CYP-SP) como la proteína de la cápside del bacteriófago P22 (CP), puesto que se distinguen dos bandas intensas del tamaño esperado siendo 47 kDa para la CP y 136.66 kDa para las proteínas de fusión (CYP_{TFIS}-SP y CYP_{WMV}-SP).

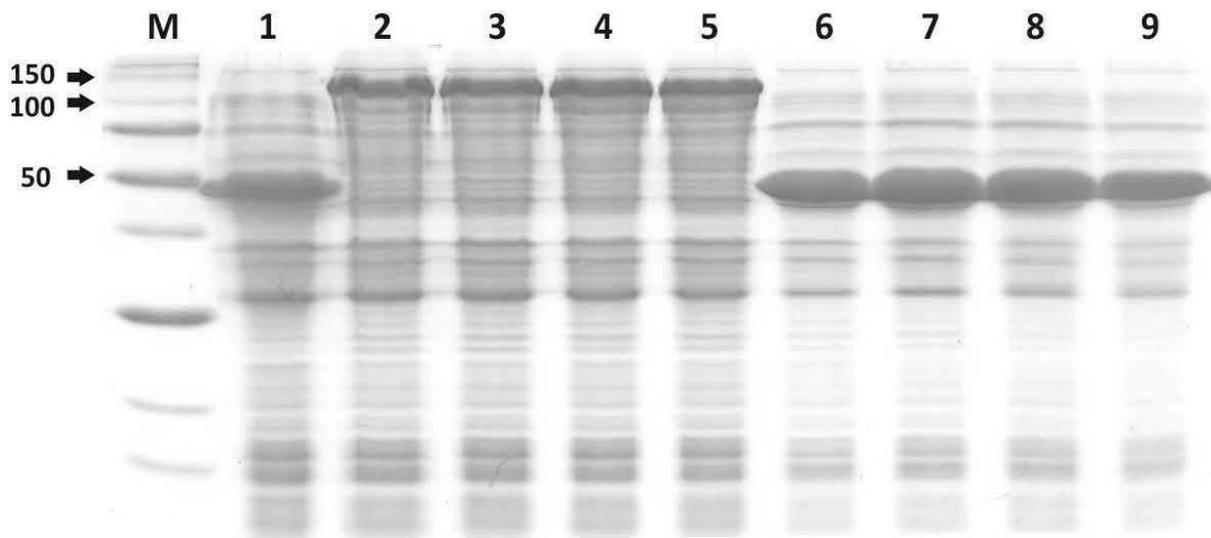


Figura 12. SDS-PAGE al 10% de la sobreexpresión de CYP-SP y CP. Se analizaron 2 clonas BL21 DE3 pBAD CYP_{TFIS}-SP + pRSF CP P22 (Carril 2 y 3 inducido con L-arabinosa y 6 y 7 inducido con IPTG), 2 colonias BL21 DE3 pBAD CYP_{WMV}-SP +pRSF CP P22 (Carril 4 y 5 inducido con L-arabinosa y 8 y 9 inducido con IPTG), clona sin inducir (carril 1) y M=Marcador de peso molecular (Precision Standard 250 kDa, Bio-Rad Labs).

La clona sin inducir (carril 1) presenta expresión basal de la CP, lo que significa que hay producción de la proteína heteróloga en ausencia del inductor IPTG. El gen que codifica para la proteína CP está bajo el control del promotor T7, el cual se encuentra bajo el control del represor de lactosa (*lacI*) que, en presencia de lactosa (o IPTG) y ausencia de glucosa induce la expresión proteica. Puesto que el medio de cultivo Terrific Broth en el cual se hizo el ensayo contiene lactosa, siempre tendremos expresión basal de la CP. Esto pudiera representar un problema ya que como reportó Zlotnick en el 2012, durante el ensam-

blado del bacteriófago P22, la proteína de andamiaje (SP) es necesaria para catalizar, estabilizar y direccionar la forma geométrica de la procápside, en ausencia de la proteína de andamiaje la CP se puede asociar y generar estructuras aberrantes.

La expresión basal puede ser controlada mediante represión catabólica, la cual consiste en agregar glucosa al medio, pues esta fuente de carbono disminuye los niveles de AMPc (AMP cíclico), la cual es una molécula necesaria para la transcripción. Otra manera de regular la expresión basal es mediante la co-expresión de la lisozima T7, la cual se une a la RNA polimerasa T7 (T7 RNAP) e inhibe la iniciación de la transcripción de cualquier gen que este bajo el promotor T7 como es en nuestro caso la CP. Una vez se induce con IPTG, la cantidad de T7 RNAP producida sobrepasa el nivel que la T7 lisozima puede inhibir y la T7 RNAP "libre" se une al promotor y finalmente inicia la transcripción del gen recombinante (Rosano & Ceccarelli, 2014).

Sin embargo, se procedió a continuar con el sistema ya desarrollado puesto que se ha visto que aunque se tenga expresión basal de la proteína de cápside es posible obtener bionanorreactores ensamblados correctamente (Tapia-Moreno et al, 2017). Para futuros trabajos se sugiere transformar la cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, la cual posee el plásmido que contiene la secuencia que codifica para la lisozima T7 para regular la expresión basal de la CP.

3.3 Expresión secuencial de CYP-SP y CP P22.

Para poder realizar la encapsulación *in vivo* del CYP dentro de la cápside del bacteriófago P22, se fusionó el gen que codifica para la enzima con la secuencia de codifica para una parte de la proteína de andamiaje (SP). Este fragmento el cual incluye los aminoácidos 141 a 303 de la proteína de andamiaje (dominio C-terminal) interactúa con las proteínas de la capa para dirigir la geometría de la cápside viral (Zlotnick et al., 2012). Se decidió cambiar los plásmidos a la cepa *E. coli* BL21 (DE3) puesto que estas células están mutadas para ser deficientes en la proteasa Lon (responsables de degradar proteínas foráneas) y la porina OmpT, que evita la pérdida de plásmidos y contiene la T7 RNAP, la cual es necesaria para transcribir la proteína CP puesto que está bajo el promotor T7 (Rosano & Ceccarelli, 2014).

Una vez teniendo las construcciones se transformó la cepa *E. coli* BL21 (DE3) con los plásmidos pBAD CYP_{TFEIS}-SP, pBAD CYP_{WMV}-SP y pRSF CP P22 para de esta manera inducir primero la expresión de la proteína de fusión y posteriormente inducir la expresión del gen que codifica para la proteína de la cápside.

Se eligió este protocolo de expresión puesto que Sánchez-Sánchez en el 2014, realizó una comparación entre co-expresión y expresión secuencial de ambas proteínas y observó que en ambos protocolos se encontraron cápsides correctamente ensambladas, sin embargo, con la expresión secuencial se consiguió aumentar el porcentaje de CYP_{BM3} (dominio hemo) activo, de un 7% que se había obtenido con co-expresión hasta un 35% con expresión secuencial, además de generar una mayor proporción de cápsides correctamente formadas, debido probablemente a una relación CYP-SP/CP más adecuada.

En este trabajo se realizaron dos metodologías de expresión secuencial (Fig. 13), donde la diferencia radica en el tiempo de inducción de la producción de la proteína de fusión CYP-SP (5 ó 16 h).

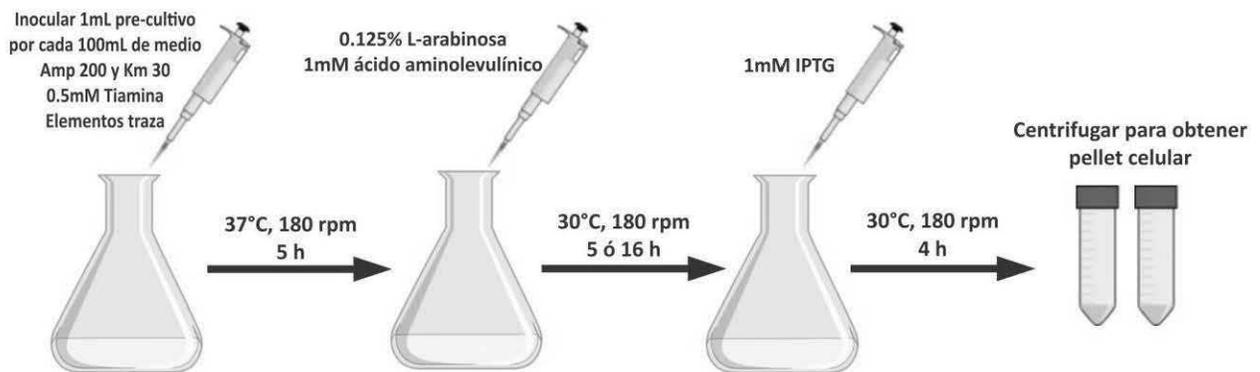


Figura 13. Esquema de inducción para la encapsulación *in vivo* de CYP-SP en P22.

Una vez realizada la inoculación con el precultivo de la clona seleccionada, se expresó primero la CYP fusionada con el dominio C-terminal de la SP utilizando L-arabinosa como inductor y el ácido aminolevulínico. Una vez terminado el tiempo de inducción de la CYP-SP, se procede a inducir la expresión de la CP con 1 mM de IPTG para después obtener mediante centrifugación un pellet bacteriano el cual contiene las cápsides virales con CYP-SP en su interior.

Se realizó un análisis electroforético mediante un gel SDS-PAGE al 10% (Fig. 14) para observar la sobreexpresión de la proteína de fusión (CYP-SP) y la proteína de la cápside (CP). Se observa que no hay una diferencia significativa en la expresión de la CYP-SP a 5 y 16 h (136.66 kDa), esto es probablemente porque la L-arabinosa es metabolizada y se deja de producir la proteína de fusión cuando el inductor se termina. Por el contrario, se puede observar una diferencia en las bandas correspondientes a la CP (47 kDa), se observa que a mayores tiempos de inducción también se tiene una mayor cantidad de proteína, esto es probablemente por la expresión basal de esta proteína (observada anteriormente en la Fig. 14).

En todos los casos se presentó sobreexpresión de ambas proteínas por lo tanto ambos cultivos se centrifugaron y el pellet se criopreservó hasta la posterior purificación de las VLPs con CYP-SP en su interior.

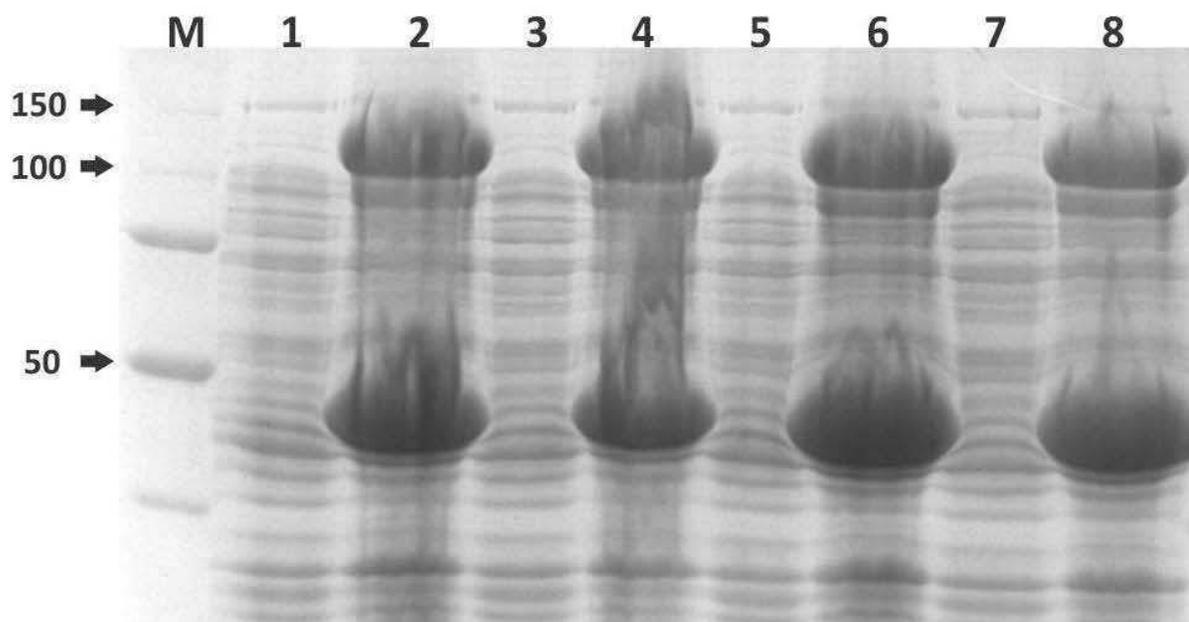


Figura 14. SDS-PAGE al 10% de expresión secuencial de la CYP-SP y de CP a 30°C. Carriles 1, 3, 5 y 7 = controles negativos sin inducir, 2 y 4 = CYP_{TFEIS}-SP y CYP_{WMV}-SP después de 9hr de expresión, 6 y 8= CYP_{TFEIS}-SP y CYP_{WMV}-SP después de 20hr de expresión y M=Marcador de peso molecular (Precision Standard 250 kDa, Bio-Rad Labs).

3.4 Purificación de VLPs P22 CYP_{TFFIS} y VLPs P22 CYP_{WMV}.

Primeramente, se procedió a la sonicación de los pellet celulares procedentes de la expresión secuencial, una vez realizado esto se centrifugó para eliminar restos celulares y así proceder a la purificación en dos fases. La primera fase involucra ultracentrifugación y la última cromatografía por filtración en gel de donde se obtendrán VLPs con alta pureza, puesto que permite la separación de moléculas en función de su tamaño. Primeramente, se ultracentrifugó en colchón de sacarosa a 215,000 g, los pellets fueron resuspendidos en el amortiguador PBS con agitación constante y una vez resuspendidos se filtraron para remover agregados.

Se realizó un análisis electroforético mediante un gel SDS-PAGE al 10% (Fig. 15) para observar todos los pasos de purificación. Esta imagen muestra una comparativa entre los pasos de purificación de las VLPs P22-CYP (VLPs P22-CYP_{TFFIS} (a) y CYP_{WMV} (b)) a diferentes tiempos de inducción de estas proteínas (9 ó 20h).

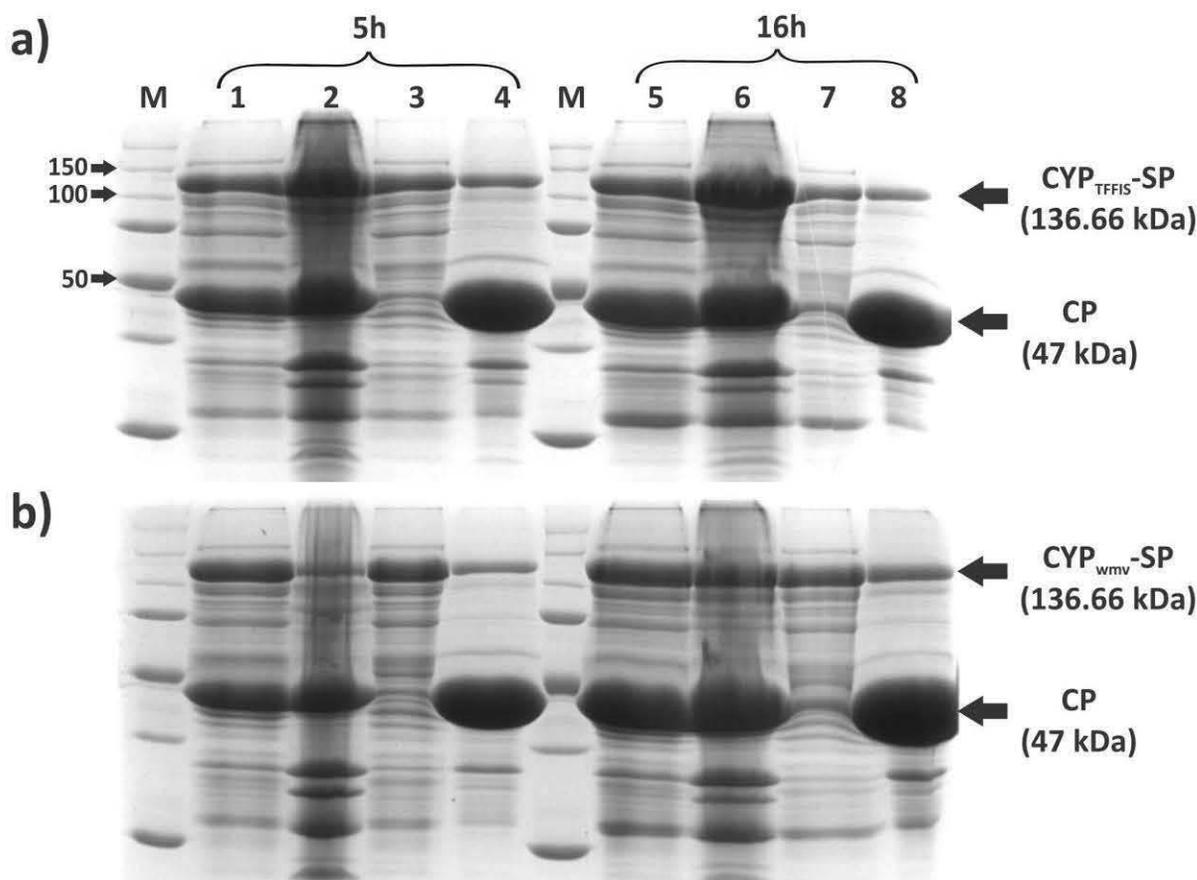


Figura 15. SDS-PAGE al 10% del primer paso de purificación de las dos variantes CYP_{TFFIS}-SP (a) y CYP_{WMV}-SP (B) a 9 y 20h de expresión. Carriles M= Marcador de peso molecular (Precision Standard 250 kDa, Bio-Rad Labs), 1 y 5= Sobrenadante una vez realizada la sonicación, 2 y 6= Pellet de la sonicación, 3 y 7 sobrenadante de la ultracentrifugación y 4 y 8 pellet de la ultracentrifugación.

Como se observa en el sobrenadante de la sonicación (carriles 1 y 5) se obtuvo tanto la proteína de fusión como la CP solubles lo que nos indicó que podemos proceder a recuperar las VLPs de dicho lisado celular. Se observa en el pellet de la sonicación (carriles 2 y 5) la presencia de ambas proteínas, lo que nos indica que una parte de las proteínas recombinantes que están siendo producidas se van a cuerpos de inclusión, puesto que cuando un gen extraño es introducido a *E. coli*, el control espacio temporal de su expresión se pierde. El péptido recombinante “nuevo” es expresado en el microambiente de *E. coli*, el cual puede diferir de la fuente original en términos de pH, osmolaridad, potencial redox, cofactores y mecanismos de plegado. Además, en caso de tener altos niveles de expresión como es nuestro caso, las interacciones hidrofóbicas en el polipéptido están presentes en altas concentraciones y disponibles para interactuar con regiones similares (Rosano & Ceccarelli, 2014). Todos estos factores pueden dar lugar a la inestabilidad y agregación de las proteínas formando cuerpos de inclusión. Para futuros trabajos se sugiere disminuir la temperatura y concentración de inductor utilizado para la inducción de la expresión de la CYP-SP y CP para controlar la formación de cuerpos de inclusión. Debido a que se contaba con suficiente proteína soluble con la cual trabajar proseguimos a ultracentrifugar el sobrenadante.

El objetivo de la ultracentrifugación es formar un pellet de VLPs con CYP-SP en su interior, se observa en el sobrenadante de la ultracentrifugación (carril 3 y 7) que hay una cantidad importante de CYP-SP que no fue encapsidada. Esto se puede deberse a diferentes razones dentro de las cuales está la posibilidad de que no hay suficientes cápsides para confinar toda la CYP-SP disponible en el medio celular. Otra razón puede ser la limitante del volumen interno de la procapside del bacteriófago P22, de tal manera que no es posible encapsidar un gran número de CYP-SP debido al tamaño de esta proteína de fusión. Para dar respuesta a esta incógnita se analizó mediante densitometría utilizando el software ImageJ (NIH) la proporción entre la CP y la CYP-SP, esto para tener una aproximación de cuantas enzimas están siendo encapsidadas utilizando el SDS-PAGE de la Fig. 15 (carriles 4 y 8) (Tabla 7).

Tabla 7. Número de enzimas CYP por cápside.

Sistema de expresión	CYP/cápside	Mconf (mM)	% Ocupación
pBAD CYP _{TFIS} -SP + pRSF CP P22 5h	21	0.61	20.0%
pBAD CYP _{TFIS} -SP + pRSF CP P22 16h	16	0.46	14.93%
pBAD CYP _{wmv} -SP + pRSF CP P22 5h	18	0.51	16.7%
pBAD CYP _{wmv} -SP + pRSF CP P22 16h	19	0.56	18.0%

Como se muestra en la Tabla 8 se encontró que las VLPs P22-CYP tienen un promedio de 18.25 (± 2.21) enzimas por cápside lo que se traduce a una concentración local promedio de enzima (molaridad de confinamiento = M_{conf}) de 0.535 mM (± 0.06). En el trabajo doctoral de Lorena Sánchez (2014), se reportó una mayor cantidad de enzimas por cápside siendo el promedio de 109.7 (± 2.8) de enzimas por cápside con una M_{conf} de 3.14 mM. Esto es probablemente porque la enzima que se encapsidó corresponde únicamente al dominio oxidasa de la CYP unida a la proteína de andamiaje la cual tiene un peso 75 kDa, mientras que la CYP-SP que estamos utilizando en este trabajo es de 136.66 kDa, por lo tanto, en principio esperaríamos una menor cantidad de enzima encapsidada.

El porcentaje de ocupación observado para todos los protocolos de expresión no supera el 20%, por lo tanto, podríamos inferir que aún hay bastante espacio dentro de la VLP el cual puede ser ocupado por enzimas. Sin embargo en algunos casos es una desventaja tener alta densidad de confinamiento dentro de las VLPs puesto que puede conllevar a problemas difusivos del sustrato y productos, lo cual es reflejado en disminución de la V_{max} y la K_M (Patterson, Prevelige, & Douglas, 2012).

Como ya se ha reportado anteriormente el número de SP que se incorporan a cada cápside depende de la disponibilidad de la proteína en la reacción, siendo el número máximo de SP por partícula dependiente del volumen de la cápside viral y no de un número específico de sitios de unión entre la SP y la proteína de capa (Parker, Casjens, & Prevelige Jr, 1998). Si tomamos en cuenta que la SP ahora está unida a la CYP la cual es una proteína globular con un radio hidrodinámico de 6.1 nm, se entiende que el número máximo de 350 SP (Parent, Zlotnick, & Teschke, 2006) por cápside no se alcanza. Este primer paso de purificación nos permite obtener VLPs con CYP en su interior y eliminar una gran proporción de otras proteínas como se puede observar en la Fig. 15 (a y b) carriles 4 y 8.

Una vez resuspendidos los pellets provenientes de la ultracentrifugación, se procedió al segundo paso de purificación, el cual consiste en una cromatografía de filtración en gel (Fig. 16). Se llevó a cabo durante un tiempo de 125 minutos, inyectando 5 mL de muestra por corrida. En trabajos anteriores ya se había determinado que la proporción de cápsides correctamente ensambladas eluyen alrededor de los 65 min y las especies aberrantes alrededor de los 45 min (Sánchez-Sánchez et al., 2014) y en un trabajo más reciente se obtuvieron también dos picos donde las especies aberrantes eluyen a los 48 min y las cápsides correctamente formadas a los 59 (Tapia-Moreno et al., 2017). En este trabajo se observaron dos picos fusionados en los cromatogramas, similares a los anteriormente reportados.

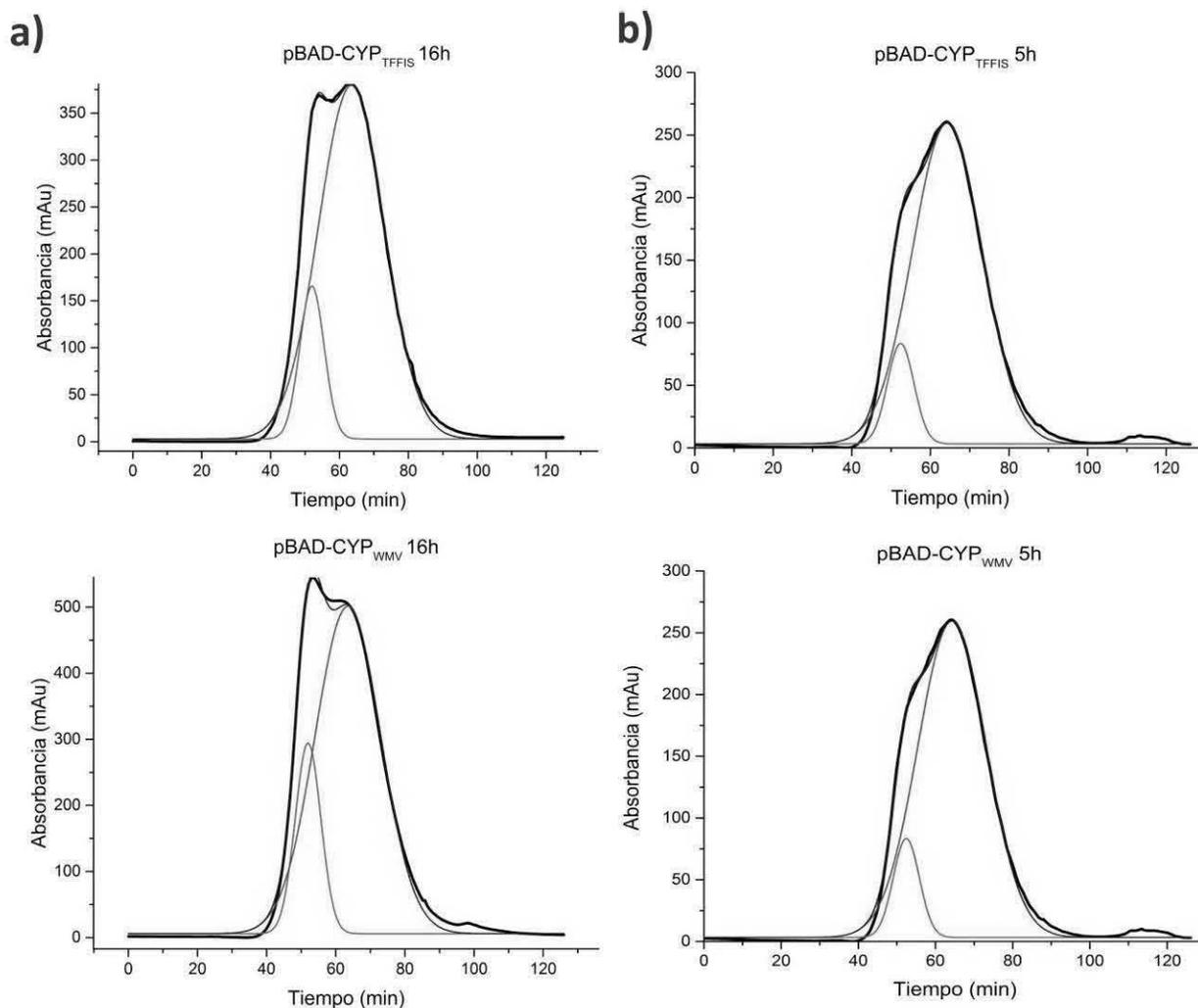


Figura 16: Análisis de la formación de VLPs P22-CYP a 30 °C mediante cromatografía de filtración en gel. El cromatograma de salida (—) fue analizado mediante deconvolución. Las estructuras correctamente ensambladas (—) eluyen alrededor de los 65 min, mientras que las estructuras aberrantes (—) eluyen alrededor de los 52 min. La elución de las proteínas fue monitoreada a $\lambda=280$.

Para todos los casos se encontraron cápsides correctamente ensambladas en la cromatografía por filtración en gel con un tiempo de retención de alrededor de 65 min y cápsides aberrantes que eluyen a los 52 min de la columna; sin embargo, la proporción de cápsides correctamente ensambladas es importante. Existen distintos motivos por los cuales se obtienen estructuras aberrantes, una de ellas es que se tiene expresión basal de la proteína de la cápside, como ya se ha visto en trabajo donde se expresó únicamente la proteína de la cápside y mediante TEM se observaron cápsides con formas irregulares, abiertas y de doble capa la cual se asocia formando polímeros en ausencia de la proteína de andamiaje (O'Neil et

al., 2013). Otra razón puede ser que no estamos utilizando toda la proteína de andamiaje. En un trabajo publicado por Parker y colaboradores en el 2008, se estudió la tasa de formación de procápsides del bacteriófago P22 *in vitro*. Observaron que al utilizar solo el C-terminal de la proteína de andamiaje en presencia de la CP se formaban procápsides y aumentaba la tasa de formación de estas con la desventaja de formar VLPs aberrantes. Sin embargo, la proporción de cápsides correctamente ensambladas a especies aberrantes es diferente para cada caso (Fig. 16). Para el protocolo de expresión secuencial de la CYP-SP y la CP se llevaron a cabo dos experimentos con distintos tiempos de inducción de la CYP-SP: 5 y 16 horas.

Se puede observar que a tiempos cortos se tiene una menor cantidad de especies aberrantes (línea verde) que a tiempos largos, esto puede ser debido a que a tiempos largos de producción de CYP-SP esta se agregue formando cuerpos de inclusión. Este secuestro de la proteína de fusión resultaría en un cambio de concentración de la CYP-SP en el medio celular así como en la relación SP/CP P22, estos dos factores influyen de manera importante en el correcto ensamblaje de la cápside P22 (Zlotnick et al., 2012).

Además, se realizó un ensayo de inducción donde se utilizó una temperatura de 37 °C, se observó que hay un incremento en la expresión basal de la proteína de la cápside (Fig. 17). Este fenómeno puede ser asociado a un incremento en el metabolismo celular lo cual conlleva al aumento de interacciones entre las proteínas lo cual favorece la asociación de estas y su posterior agregación. Por lo tanto, estos resultados indican que el nivel de expresión de la proteína de fusión (CYP-SP) es central para formar cápsides correctamente ensambladas.

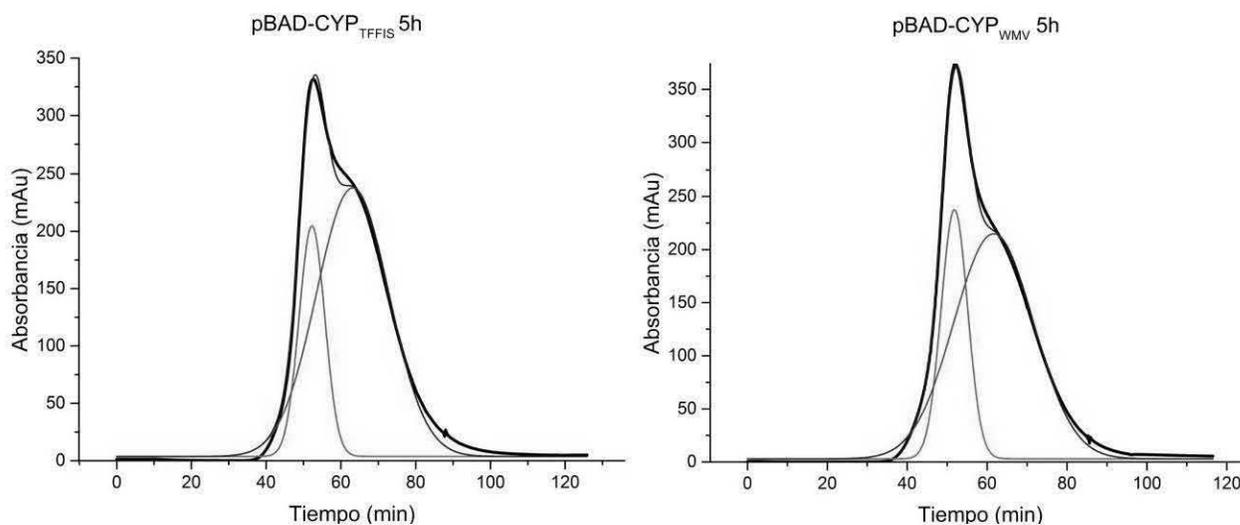


Figura 17. Análisis de la formación de VLPs P22-CYP a 37°C mediante cromatografía de filtración en gel. El cromatograma de salida (—) fue analizado mediante deconvolución. Mayor proporción de estructuras aberrantes (—) que estructuras correctamente ensambladas (—). La elución fue monitoreada a $\lambda=280$.

3.5 Análisis de las VLPs por medio de DLS y TEM.

Se separaron las fracciones de las VLPs aberrantes de las correctamente formadas para su caracterización. El tamaño (diámetro hidrodinámico) y distribución de tamaño de las VLPs provenientes de la cromatografía por filtración en gel, fue determinado por dispersión de luz dinámica (DLS) con el equipo Zetasizer NanoZS (Malvern, UK). Una vez analizadas por DLS se procedió a preparar y analizar las estructuras correctamente formadas mediante microscopía electrónica de transmisión utilizando la tinción negativa de acetato de uranilo.

Para el caso de las VLPs CYP WMV se obtuvo un diámetro hidrodinámico promedio de 69.48 nm para las VLPs bien formadas y 83.65 nm para las estructuras aberrantes (Fig. 18a). Las micrografías del TEM (Fig. 18b) permitieron determinar dimensiones de las partículas, donde mediante el software ImageJ (U.S. National Institutes of Health) se determinó el diámetro promedio el cual fue de 63.36 (± 7) nm (Fig. 21b).

En el caso de las VLPs CYP TFFIS se obtuvo un diámetro hidrodinámico promedio de 69.29 nm para las VLPs bien formadas y 88.68 nm para las estructuras aberrantes (Fig. 19a). Las micrografías del TEM (Fig. 19b) permitieron determinar dimensiones de las partículas, donde mediante el software ImageJ (U.S. National Institutes of Health) se determinó el diámetro promedio el cual fue de 63.4 (± 7) (Fig. 22b). Esta técnica de tinción permitió observar la estructura icosaédrica característica de las cápsides tipo virus. Se puede observar en las micrografías que se obtuvieron VLPs con CYP en su interior y otras vacías. Además se pueden observar estructuras semi cerradas, esto podría ser a causa de que no hay suficiente CYP-SP, que como sabemos la proteína de andamiaje favorece esta conformación energéticamente estable (Zlotnick et al., 2012).

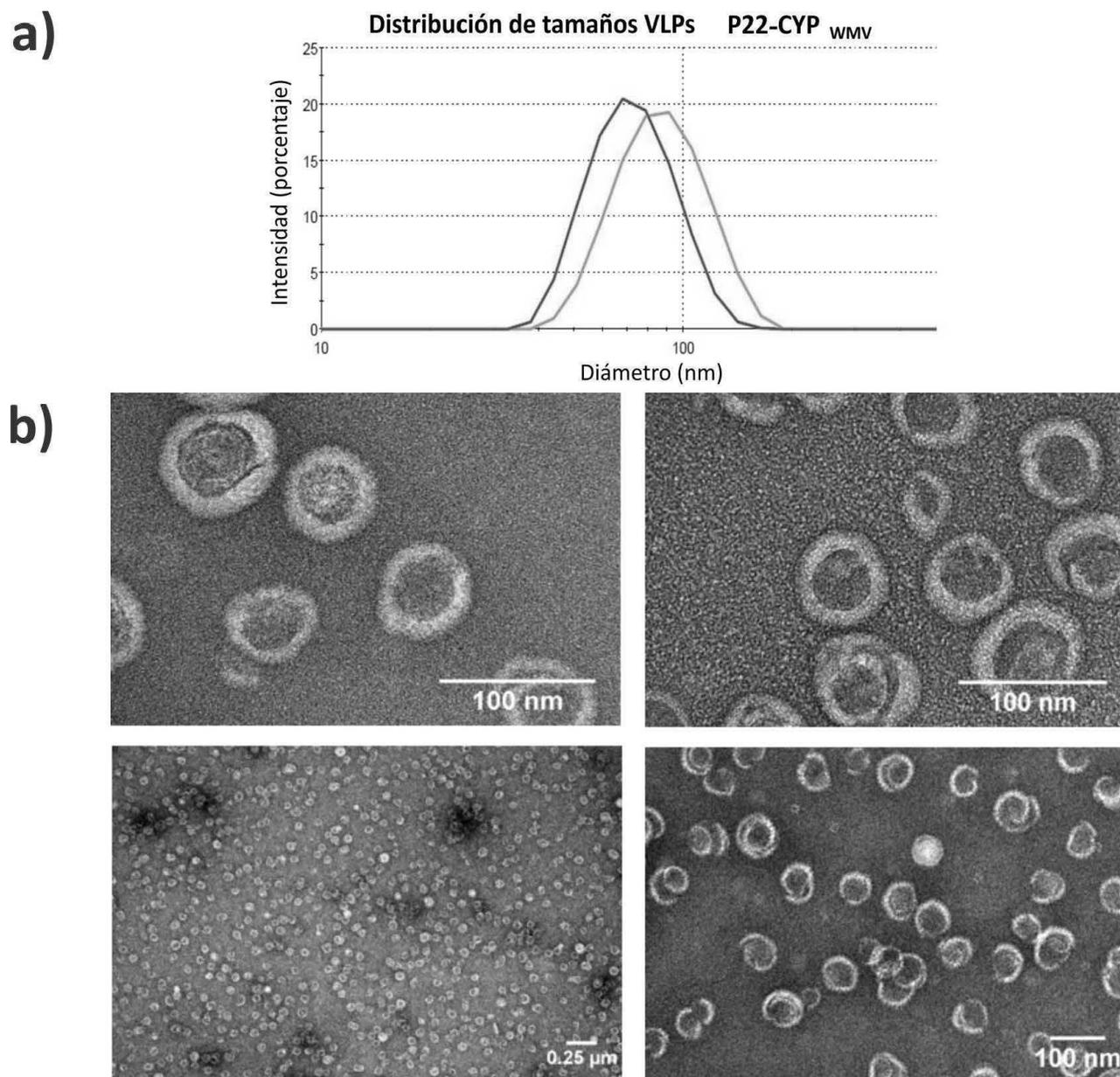
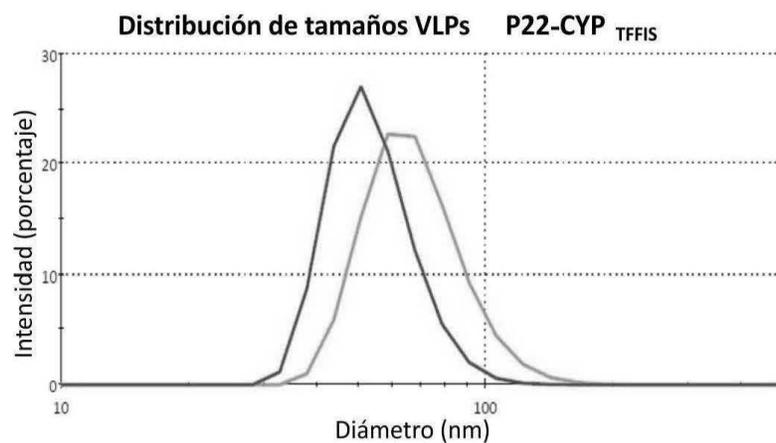


Figura 18. Caracterización estructural de las VLP VLP P22-CYP_{wmv}. Distribución de tamaño mediante DLS (a) donde la línea verde representa las estructuras aberrantes y la línea roja representa las estructuras bien formadas. Partículas P22-CYP vistas en TEM. Tinción negativa con acetato de uranilo (b).

a)



b)

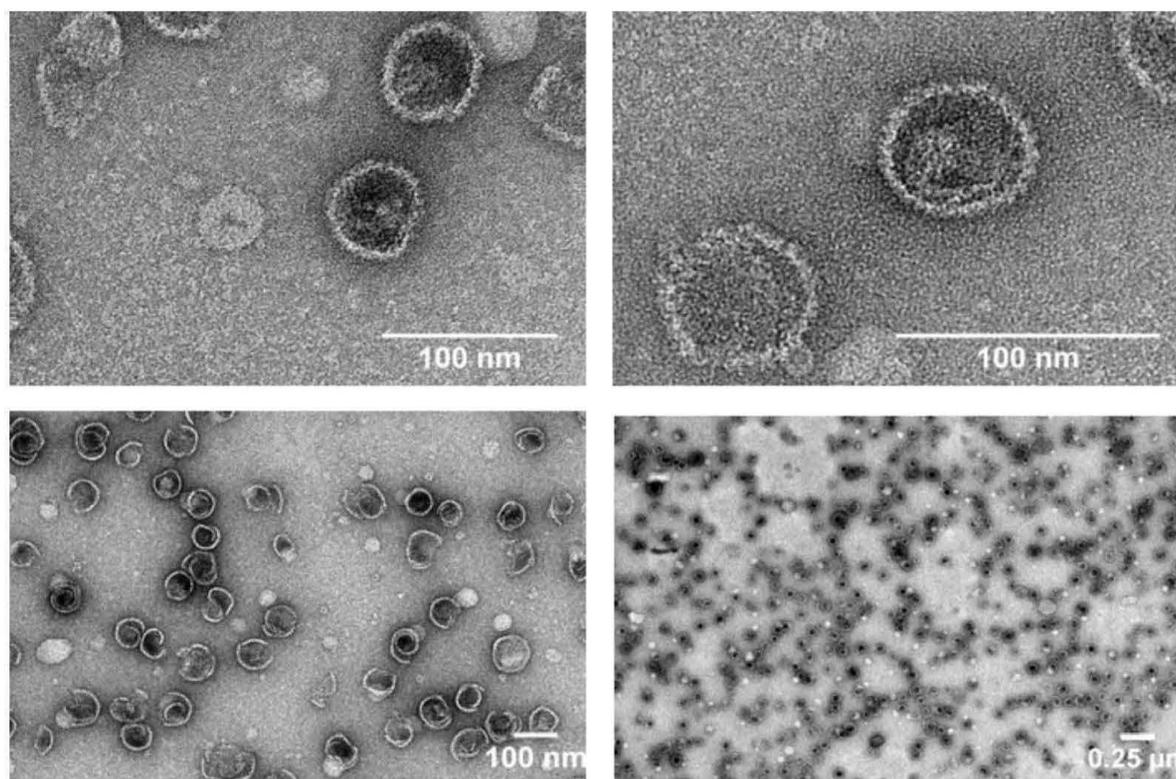


Figura 19. Caracterización estructural de las VLP VLP P22-CYP_{TFIS}. Distribución de tamaño mediante DLS (a) donde la línea verde representa las estructuras aberrantes y la línea roja representa las estructuras bien formadas. Partículas P22-CYP_{TFIS} vistas en TEM. Tinción negativa con acetato de uranilo (b).

3.6 Determinación de la actividad CYP de VLPs P22-CYP.

El CYP_{BM3} cataliza de manera natural la hidroxilación de ácidos grasos, sin embargo, la medición de los metabolitos requiere de equipos como el HPLC, lo que consume gran cantidad de tiempo. Por lo que se buscó un sustrato alternativo que pudiera ser transformado por la enzima y cuyo producto pudiera ser medido por espectrofotometría UV/VIS, como es el caso del compuesto fenólico 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMF). Como se mencionó anteriormente estas cápsides virales funcionan como nanobiorreactores, el sustrato (2,6-DMF) se difunde a través de la VLP. Al entrar en contacto con la enzima CYP_{BM3} el sustrato se transforma y el producto (3,3',5,5'-tetrametoxi bifenil-4,4'-diol) sale de la VLP. El aumento del producto con respecto al tiempo puede ser medido fácilmente medido a una $\lambda = 468 \text{ nm}$ (Fig.20).

Con la finalidad de saber si las VLPs P22-CYP generadas en este trabajo eran catalíticamente activas en presencia de NADPH se procedió a utilizar este método colorimétrico, utilizando 2,6-dimetoxifenol (2,6-DMF) como sustrato y NADPH, 500 μM y 0.06 μM respectivamente (Fig. 21). La reacción se llevó a cabo a 37°C y se tomaron lecturas a 468 nm cada 10 minutos utilizando el espectrofotómetro PekinElmer.

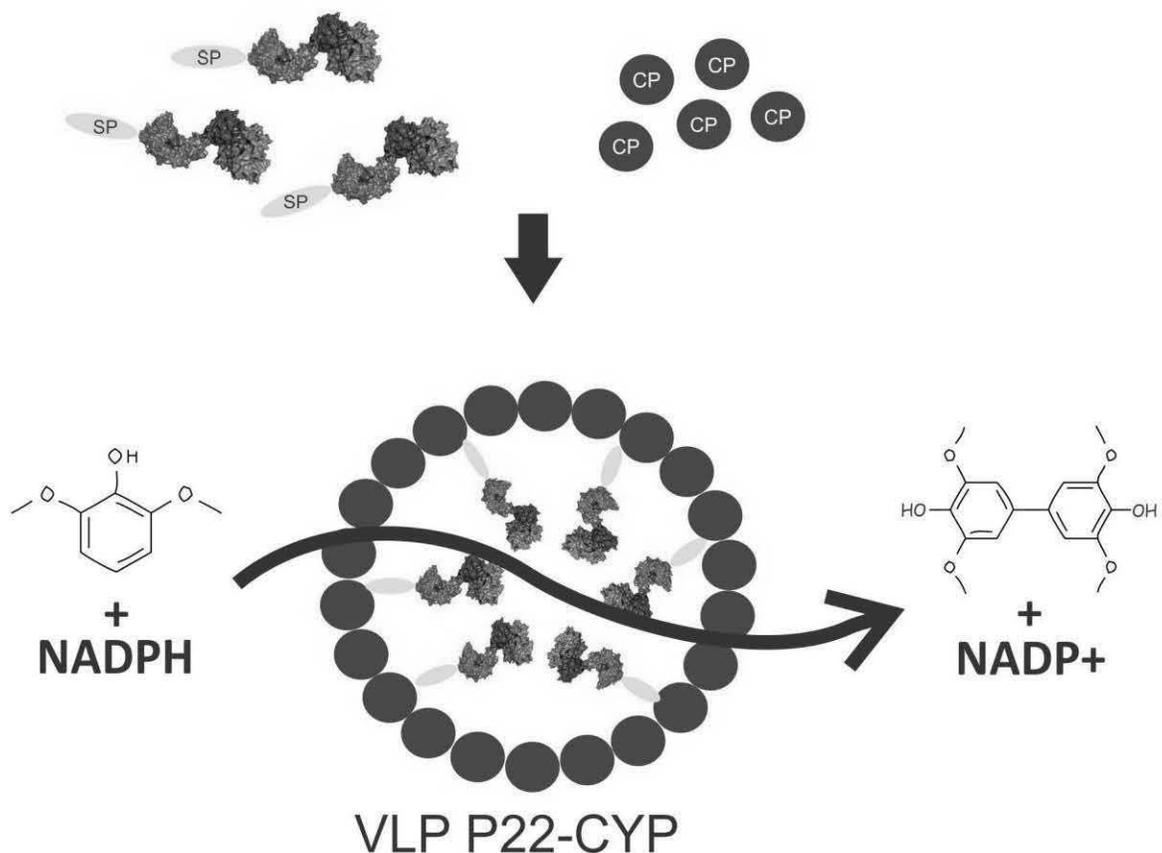


Figura 20. Representación del ensamblaje y actividad de las VLP P22-CYP. El ensamblaje de las VLPs se lleva a cabo mediante la unión no covalente entre la proteína de andamiaje (SP) y la proteína de la cápside (CP). Estas VLPs con capaces de transformar el 2,6-DMF generando un dímero del 2,6-DMF (3,3',5,5'-tetrametoxi bifenil-4,4'-diol) utili-

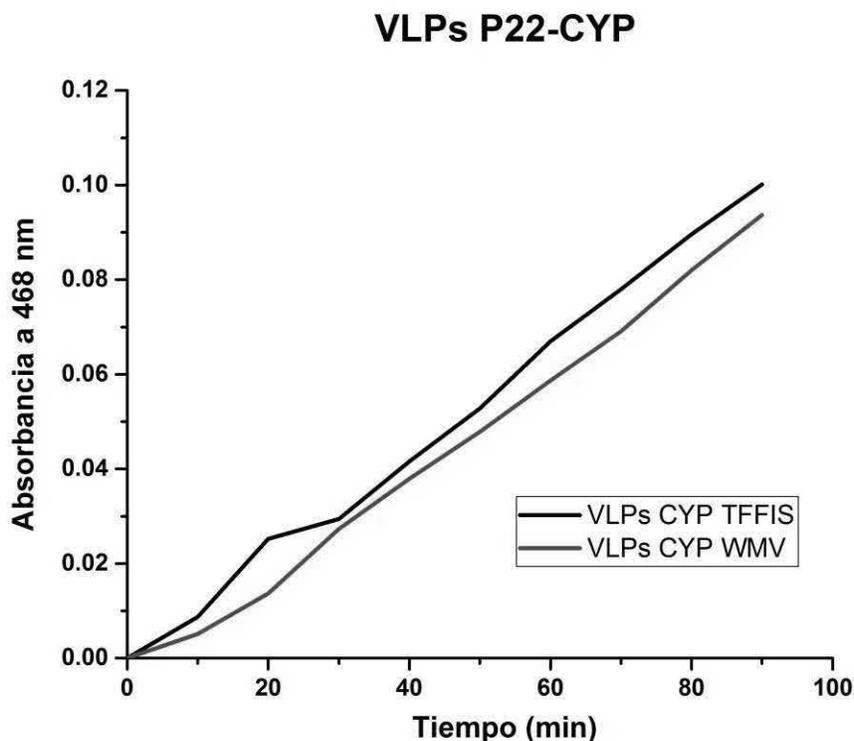


Figura 21. Grafica de actividad de VLPs P22-CYP variantes TFFIS y WMV. Utilizando como sustrato 2,6-DMF y NADPH como fuente de electrones.

Se comprobó que los nanobiorreactores son catalíticamente activos para la transformación del 2,6-DMF en presencia de NADPH, obteniendo una actividad específica de 3.19 y 4.30 nanomoles/mg/hr para las VLPs P22-CYP TFFIS y VLPs P22-CYP WMV, respectivamente (Tabla 8).

Tabla 8. Actividades específicas de los VLPs P22-CYP.

Sistema	Actividad específica [nanomoles/mg/hr]	Ref.
VLPs P22-CYP TFFIS	3.19	Este trabajo
VLPs P22-CYP WMV	4.30	Este trabajo
CYP WMV Libre	44.65	Frasco et al.*

*Trabajo de tesis de licenciatura sin publicar.

Podemos observar que la actividad específica del sistema VLP P22-CYP WMV es un orden de magnitud menor con respecto a la enzima libre. Esta disminución en la actividad catalítica se ha observado anteriormente al encapsidar el dominio oxidasa dentro de las cápsidas derivadas del bacteriófago P22 (Sánchez-Sánchez et al., 2015; Tapia-Moreno et al., 2017). Una de las razones por las cuales puede suceder esto es debido a problemas difusionales, donde el radio hidrodinámico de los sustratos, el poro de la cápside y el ambiente electrostático juegan un papel muy importante. Así mismo podría deberse a las restricciones en la flexibilidad enzimática, ya que la enzima al ser confinada puede sufrir de restricciones en cambios conformacionales que le permitan realizar la catálisis (Patterson et al., 2012). Además, el hecho de haber fusionado genéticamente la enzima a una parte de la proteína de andamiaje puede haber afectado en la transferencia de electrones necesaria para la oxidación del sustrato. Sin embargo, este trabajo demuestra que es posible confinar la CYP completa dentro de la VLP-P22 y que es activa utilizando NADPH en lugar de peróxido, pudiendo llevar esta propuesta terapéutica a aplicaciones clínicas.

Capítulo 4. Conclusiones

- Se diseñaron dos construcciones para la expresión recombinante de la CYP_{BM3} completa mutantes TFFIS y WMV, las cuales estaban fusionadas con una parte de la proteína de andamiaje (C-terminal).
- La producción de partículas tipo virus del bacteriófago P22 el cual contiene CYP_{BM3} completa en su interior *in vivo* fue exitosa bajo todos los protocolos de expresión, llegando a rendimientos de 40 mg/mL de nanoreactores.
- La estrategia de purificación mediante ultracentrifugación y cromatografía por filtración en gel dio lugar a nanoreactores altamente puros con un diámetro promedio de 63.3 (± 7) y 63.4 (± 7) para las VLPs con la variante de CYP TFFIS y CYP WMV respectivamente.
- Los nanoreactores con CYP_{BM3} completa en su interior fueron activos en la transformación de 2-6 dimetoxifenol, utilizando NADPH como fuente de electrones, con una actividad específica de 3.19 y 4.30 nanomoles/mg/hr para la variante de CYP TFFIS y CYP WMV respectivamente.

Capítulo 5. Perspectivas

En trabajos posteriores se sugiere utilizar la cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLysS la cual contiene el plásmido que codifica para la lisozima T7, de manera que se controle la expresión basal de la proteína de la cápside y consecuentemente aumentar el rendimiento de las VLPs correctamente formadas.

Sería conveniente buscar una estrategia para aumentar la cantidad de enzima dentro de la VLP o en su defecto utilizar una VLP más grande, de manera que pueda albergar una mayor cantidad en CYP y consecuentemente tener una mayor actividad catalítica en los bionanorreactores.

La construcción de estos nanobiorreactores, a base de cápsides virales con CYP en su interior es un primer paso para la generación de sistemas de suministro de actividad enzimática, los cuales tienen el potencial para hacer más eficientes procedimientos médicos como la quimioterapia. En un futuro se podría funcionalizar estos nanobiorreactores con algún polímero biocompatible como es el polietilenglicol (PEG) el cual puede ser acoplado con un ligando específico para receptores presentes en células cancerosas como es el caso del β -estradiol, para dirigirlos a células de cáncer de mama y analizar si es posible disminuir la cantidad del profármaco tamoxifeno necesario para inducir la muerte de las células cancerosas.

Literatura citada

- Aigrain, L., Pompon, D., Moréra, S., & Truan, G. 2009. Structure of the open conformation of a functional chimeric NADPH cytochrome P450 reductase. *EMBO Reports*, 10(7), 742–747.
- Blanco, E., Shen, H., & Ferrari, M. 2015. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature Biotechnology*, 33(9), 941–951.
- Comellas-Aragonès, M., Engelkamp, H., Claessen, V. I., Sommerdijk, N. A. J. M., Rowan, A. E., Christianen, P. C. M., Nolte, R. J. M. 2007. A virus-based single-enzyme nanoreactor. *Nature Nanotechnology*, 2(10), 635–639.
- Fiedler, J. D., Brown, S. D., Lau, J. L., & Finn, M. G. 2010. RNA-directed packaging of enzymes within virus-like particles. *Angewandte Chemie - International Edition*, 49(50), 9648–9651.
- Frederik Rurup, W., Verbij, F., Koay, M. S. T., Blum, C., Subramaniam, V., & Cornelissen, J. J. L. M. 2014. Predicting the loading of virus-like particles with fluorescent proteins. *Biomacromolecules*, 15(2), 558–563.
- Guengerich, F. P. 1993. Cytochrome P450 Enzymes. *American Scientist*, 81(5), 440–447. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/29775011>
- Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K. M., & Bernhardt, R. 2007. Cytochrome P450 systems-biological variations of electron transport chains. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1770(3), 330-344.
- Hosea, N. a, Miller, G. P., & Guengerich, F. P. 2000. Elucidation of Distinct Ligand Binding Sites for Cytochrom P450 3A4. *Biochemistry*, 39(20), 5929-5939.
- Koyani, R., Pérez-Robles, J., Cadena-Nava, R. D., & Vazquez-Duhalt, R. 2017. Biomaterial-based nanoreactors, an alternative for enzyme delivery. *Nanotechnology Reviews*, 6(5). doi: 10.1515/ntrev-2016-0071
- Lee, L. A., Niu, Z., & Wang, Q. 2009. Viruses and virus-like protein assemblies-Chemically programmable nanoscale building blocks. *Nano Research*, 2(5), 349–364.
- Lewis, D. F. V. 1996. Cytochromes P450: Structure, function and mechanism. London: Taylor & Francis.
- Matsumura, Y., & Maeda, H. 1986. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumor-tropic accumulation of proteins and the antitumor agents Smancs. *Cancer Research*, 46(12), 6387–6392.
- Minten, I. J., Nolte, R. J. M., & Cornelissen, J. J. L. M. 2010. Complex assembly behavior during the encapsulation of green fluorescent protein analogs in virus derived protein capsules. *Macromolecular Bioscience*, 10(5), 539–545.
- O'Neil, A., Prevelige, P. E., & Douglas, T. 2013. Stabilizing viral nano-reactors for nerve-agent degradation. *Biomaterials Science*, 1(8), 881-886.
- Parent, K. N., Zlotnick, A., & Teschke, C. M. 2006. Quantitative analysis of multi-component spherical virus assembly: scaffolding protein contributes to the global stability of phage P22 procapsids. *Journal of Molecular Biology*, 359(4), 1097–1106.

- Parker, M. H., Casjens, S., & Prevelige Jr, P. E. 1998. Functional domains of bacteriophage P22 scaffolding protein, *Journal of Molecular Biology*, 281(1), 69-79.
- Patterson, D. P., Prevelige, P. E., & Douglas, T. 2012. Nanoreactors by programmed enzyme encapsulation inside the capsid of the bacteriophage P22. *ACS Nano*, 6(6), 5000–5009.
- Ritter, C., Nett, N., Acevedo-Rocha, C. G., Lonsdale, R., Kräling, K., Dempwolff, F., Hoebenreich, S., Graumann, P. L., Reetz, M. T. and Meggers, E. 2015. Bioorthogonal Enzymatic Activation of Caged Compounds. *Angewandte Chemie*, 54(45) 13440–13443.
- Roco, M. C. 2003. Nanotechnology: Convergence with modern biology and medicine. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(3), 337-346.
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. 2014. Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5(4), 1–17.
- Sánchez-Sánchez, L., Cadena-Nava, R. D., Palomares, L. A., Ruiz-Garcia, J., Koay, M. S. T., Cornelissen, J. J. M. T., & Vazquez-Duhalt, R. 2014. Chemotherapy pro-drug activation by biocatalytic virus-like nanoparticles containing cytochrome P450. *Enzyme and Microbial Technology*, 60, 24–31.
- Sánchez-Sánchez, L. P. 2014. Diseño y caracterización de partículas pseudovirales biocatalíticas. Tesis de doctorado. Instituto de Biotecnología, UNAM.
- Sánchez-Sánchez, L., Tapia-Moreno, A., Juarez-Moreno, K., Patterson, D. P., Cadena-Nava, R. D., Douglas, T., & Vazquez-Duhalt, R. 2015. Design of a VLP-nanovehicle for CYP450 enzymatic activity delivery. *Journal of Nanobiotechnology*, 13(1), 66.
- Steinmetz, N. F., & Evans, D. J. 2007. Utilization of plant viruses in bionanotechnology. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 5(7), 2891-2902.
- Strable E., Finn M.G. 2009. Chemical modification of viruses and virus-like particles. In: manchester M., Steinmetz N.F. (eds) *Viruses and Nanotechnology. Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol 327. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Tapia-Moreno, A., Juarez-Moreno, K., Gonzalez-Davis, O., Cadena-Nava, R. D., & Vazquez-Duhalt, R. 2017. Biocatalytic virus capsid as nanovehicle for enzymatic activation of Tamoxifen in tumor cells. *Biotechnology Journal*, 12(6), 1–13.
- Teschke, C. M., & Parent, K. N. 2010. “Let the phage do the work”: Using the phage P22 coat protein structures as a framework to understand its folding and assembly mutants. *Virology*, 401(2), 119-130.
- Torchilin, V. 2011. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(3), 131–135.
- Xu, G., & Mcleod, H. L. 2001. Strategies for enzyme / prodrug cancer therapy. *Clinical Cancer Research*, 7(11), 3314–3324.
- Yildiz, I., Shukla, S., & Steinmetz, N. F. 2011. Applications of viral nanoparticles in medicine. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(6), 901-908.

- Zeltins, A. 2013. Construction and characterization of virus-like particles: A review. *Molecular Biotechnology*, 53(1), 92-107.
- Zlotnick, A., Suhanovsky, M. M., & Teschke, C. M. 2012. The energetic contributions of scaffolding and coat proteins to the assembly of bacteriophage procapsids. *Virology*, 428(1), 64–69.

Anexos

1.- Plásmidos utilizados

