



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE ENCAPSULINA A DE *Mixococcus xanthus* Y
ENSAMBLE DE NANOCOMPARTIMENTOS PROTEICOS *IN VITRO*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
MA. DOLORES OZUNA ARROYO

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. ARMANDO HERNÁNDEZ GARCÍA
[Instituto de Química](#)
Dr. ENRIQUE GARCÍA HERNÁNDEZ
[Instituto de Química](#)

Ciudad de México. Abril, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Daniel Alejandro Fernández Velasco
VOCAL	Martín González Andrade
VOCAL	Lilian González Segura
VOCAL	José de Jesús García Trejo
SECRETARIO	Luis Alfonso Vaca Domínguez

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas por ser el recinto donde me desarrollé como profesional y fomentó en mí la curiosidad científica.

A mi tutor principal, el Dr. Ismael Bustos Jaime, por recibirme en su grupo de trabajo, brindarme sus enseñanzas, asesorías y los recursos necesarios para la culminación de este proyecto, por su inmensa paciencia y confianza en mí y el proyecto. ¡Muchas gracias!

A mi comité tutor, Dr. Enrique García Hernández y el Dr. Armando Hernández García, por sus continuos consejos, asesorías y retroalimentación a lo largo del proyecto dando como resultado el presente trabajo.

A las técnicas académicas del Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas (LFQIP), Dra. María Isabel Velázquez López, M. en C. Laura Iliana Álvarez Añorve y Q. F. B. Eugenia Flores Robledo, por el tiempo y asesoría técnica otorgada para la realización del presente proyecto.

A la M.C. Josefina Valadez García, por sus valiosas fotografías y el tiempo dedicado a estas, que sin duda alguna enriquecieron el presente trabajo.

A mi jurado de examen, Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco, Dr. Martín González Agrade, Dra. Lilian González Segura, Dr. José de Jesús García Trejo y Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez, por sus certeros comentarios y valiosa retroalimentación al presente escrito.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), UNAM, IN 205119, por otorgar los recursos para llevar a cabo este proyecto.

Durante el desarrollo de este proyecto fui beneficiada con una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) para apoyo a estudios de maestría.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mamá, Magdalena Arroyo y papá, Cristino Ozuna, a quienes les debo todo su apoyo emocional y ejemplo de dedicación al trabajo.

A mis hermanos, Kitty y Lalo mis editores de vida, los quiero mucho.

Las palabras no bastaran para expresar todo el agradecimiento que siento con las personas que estuvieron presentes en el desarrollo de este proyecto y a aquellas que han llegado hasta la culminación de este, considérense parte de él.

Mil gracias al jefe del equipo VLP, el Dr. Ismael Bustos Jaimes por sus pláticas motivacionales acompañados de café y galletas; el tiempo invertido en consejos y seminarios dieron como resultado este trabajo.

A mis compañeros del grupo de trabajo, que con el tiempo y experiencias se volvieron amigos: Ahsanty Iris, Carlitos, Chepina, Hugo, Ignacio, Javier, Lalo, Lourdes, Maribel y Willy, quienes me acompañaron durante muchas horas de café, desarrollo de ensayos, fallos y éxitos experimentales.

A los compañeros y amigos del laboratorio LFQIP: Ricardo, Esaú, Hugo L., Fátima, Alex, Eréndira, Cinthya, Eva, por compartir sus experiencias, conocimientos y el tiempo compartido durante mi estancia en el laboratorio.

No me queda más que decir, muchas gracias, espero en algún momento de la vida volver a compartir tiempo de trabajo y sépanse que mi estancia en el LFQIP siempre fue grata y apasionante cada día de trabajo.

Contenido

RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	8
ESTRUCTURA PROTEICA DE LAS ENCAPSULINAS	11
ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS NCEs	13
ENCAPSULINA DE <i>Mycoccus xanthus</i>	14
LAS ENCAPSULINAS EN LA BIONANOTECNOLOGÍA	16
ENSAMBLES <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DE NCEs	18
HIPÓTESIS	20
OBJETIVO GENERAL	20
Objetivos particulares.....	20
ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO	21
MATERIAL Y METODOLOGÍA	22
Proteínas recombinantes.....	24
SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA EncA	26
SOBREEXPRESIÓN DE SFGFP-CLP	27
PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	28
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y PUREZA DE EncA y sfGFP-CLP ... 28	
CARACTERIZACIÓN DE MxNCEs	30
Métodos hidrodinámicos:	30
Métodos microscópicos:.....	30
DETERMINACIÓN DE CONDICIONES FÍSICOQUÍMICAS PARA EL DESENSAMBLE DE MxNCEs	33
CARACTERIZACIÓN DEL DESENSAMBLE DE MxNCEs POR HCIGnd	33
ENSAMBLE <i>IN VITRO</i> DE MxNCEs BAJO CONDICIONES FÍSICOQUÍMICAS DETERMINADAS	36
CARACTERIZACIÓN DEL ENSAMBLE <i>IN VITRO</i> DE MxNCEs	37
ENCAPSULAMIENTO <i>IN VITRO</i> DE SFGFP-CLP	38
ENCAPSULAMIENTO <i>IN VIVO</i> DE SFGFP-CLP	39
DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE REENSAMBLE Y ENCAPSULAMIENTO <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DE LOS MxNCEs	40
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
OBTENCIÓN DE CÉLULAS TRANSFORMANTES <i>E. coli</i> BL21(DE3)	41

SOBREEXPRESIÓN DE EncA Y sfGFP-CLP EN <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	41
PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	42
DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN Y GRADO DE PUREZA DE EncA Y sfGFP-CLP	43
CARACTERIZACIÓN DE MxNCEs PRODUCIDOS EN <i>E.coli</i> BL21(DE3)	43
DETERMINACIÓN DE CONDICIONES FISICOQUÍMICAS PARA EL DESENSAMBLE DE MxNCEs	44
CARACTERIZACIÓN DEL DESENSAMBLE DE MxNCEs	49
CARACTERIZACIÓN DEL ENSAMBLE <i>IN VITRO</i> DE MxNCEs BAJO CONDICIONES FISICOQUÍMICAS CONTROLADAS	53
ENCAPSULAMIENTO <i>IN VITRO</i> DE sfGFP-CLP	56
COEXPRESIÓN DE EncA y sfGFP-CLP <i>IN VIVO</i>	59
CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEINAS COEXPRESADAS	60
EFICIENCIA DE ENCAPSULAMIENTO <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DE sfGFP EN MxNCEs	62
CONCLUSIONES	68
PERSPECTIVAS	70
REFERENCIAS	71
ANEXOS	76
Anexo 1	76
Anexo 2	78
Anexo 3	80

RESUMEN

Los nanocompartimentos de encapsulinas (NCEs) son arreglos supramoleculares de proteínas, que forman estructuras tipo cápside y contienen enzimas asociadas al metabolismo de ciertas especies que es conveniente tener aisladas del citosol en procariontes y arqueas. El conjunto de proteínas que conforman a los NCEs son: una proteína envoltura (encapsulina, Enc) con un plegamiento similar a la proteína gp5 del bacteriófago HK97 y una o dos proteínas cargamento que se internalizan con alta especificidad gracias a un péptido denominado péptido de carga del cargamento (CLP, *Cargo Loading Peptide*). La cubierta del NCE de *M. xanthus* (MxNCE) está formada por la proteína encapsulina A (EncA), de 32.5 kDa, que forma una estructura icosaédrica de 32 nm de diámetro a partir de 180 copias de sí misma. Las proteínas cargamento del MxNCE son encapsuladas por su CLP en el extremo C-terminal de 8 residuos de aminoácido (LTVGSLRR). Los MxNCEs pueden ser utilizados como nanosistemas multifuncionales para el envío o acarreo de moléculas heterólogas unidas al CLP. En este trabajo nos proponemos estudiar el proceso de desensamble y ensamble del MxNCE en diversas condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica con el objetivo de establecer el efecto de factores fisicoquímicos en el ensamble *in vitro* de la proteína EncA en MxNCEs y evaluar el encapsulado de la proteína heteróloga sfGFP-CLP (*superfolder Green Fluorescent Protein-Cargo Loading Peptide*, por sus siglas en inglés). El desensamble y reensamble del MxNCE se analizó mediante técnicas hidrodinámicas, espectroscópicas y microscópicas. Determinamos que bajo condiciones particulares es posible desensamblar reversiblemente a los MxNCEs y posteriormente se comprobó la internalización de la sfGFP-CLP al MxNCE reensamblado. Nuestros resultados indican que las encapsulinas son sistemas que se pueden reensamblar *in vitro* bajo condiciones controladas, cargar de forma específica y eficiente sin comprometer el ensamble del nanocompartimento. También encontramos que los MxNCEs pueden ensamblarse *in vivo* y encapsular proteínas heterólogas coexpresadas con EncA, siempre y cuando presenten el CLP. Los MxNCEs ensamblados *in vivo* encapsulan proteínas heterólogas con mayor eficiencia que su contraparte encapsulada *in vitro* y su morfología fue más homogénea.

INTRODUCCIÓN

En las células eucariontes existe un sistema de membranas a base de lípidos llamados organelos, encargados de separar, almacenar y secretar metabolitos, generando una organización metabólica dentro de la célula. Las células procariontes también cuentan con un sistema de compartimentalización tipo organelos, estos son pequeños compartimentos llamados organelos proteicos; proteínas tipo cápsides que se autoensamblan dentro de la célula (Giessen, 2016; Giessen et al., 2019).

Los compartimentos proteicos varían en tamaño, organización geométrica y complejidad por el número de proteínas que los conforman (Nichols et al., 2017). Entre los compartimentos más grandes y complejos se encuentran los microcompartimentos bacterianos (BMCs), cuerpos proteicos poliédricos con diámetros de entre 40-500 nm que concentran enzimas, aumentando la efectividad catalítica, por ejemplo los carboxisomas, encargados de concentrar a las enzimas ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCo) y anhidrasa carbónica (CA), del ciclo de Calvin-Benson-Bassham, que sirve para fijar CO₂ como 3-fosfoglicerato, un intermediario de la glucólisis. Otros microcompartimentos bacterianos son los Pdu (*Propanediol utilization*) BMCs, que contienen a las enzimas diol-dihidratasa y propionaldehído deshidrogenasa encargadas de la degradación del 1,2-propanonodiol, y los Eut (*Ethanolamine*) BMCs, que cuentan con enzimas para la transformación de la etanolamina a acetaldehído y amonio (Kerfeld et al., 2018). Otros complejos proteicos formadores de compartimentos menos complejos y más pequeños, pero no por ello menos eficientes, son los nanocompartimentos de encapsulina (NCEs), proteínas tipo cápsides que van de los 20 a los 40 nm de diámetro, presentes en procariontes y arqueas, encargados de diferentes reacciones metabólicas, como el NCE de *Brevibacterium linens* que almacena a la peroxidasa decolorante de tinte (peroxidasa de tipo DyP) (Putri et al., 2017), y el NCE de *Thermotoga maritima*, que en su interior contiene dos enzimas tipo ferritina (FLP) o DyP (Sutter et al., 2008). Por último, entre los complejos proteicos de compartimentalización se encuentran los compartimentos de proteínas pequeñas, proteínas multiméricas que forman complejos de 8-16 nm de diámetro como las ferritinas, peroxidases DyP, la aldosa-di-hidropterina (FolB), generalmente enzimas que necesitan oligomerizar para realizar su función catalítica (Giessen, 2016).

Las encapsulinas, como sistemas de compartimentalización, son un grupo de nanocompartimentos de proteínas estudiados recientemente con una diversidad interesante. Su presencia en organismos diversos, función fisiológica, estructura proteica y posibles usos en la biotecnología están siendo descubiertos aún. Hasta la fecha solo se conocen alrededor de 937 organismos que presentan el operón de encapsulinas (definido por el gen de encapsulina y el conjunto de genes de la proteína cargamento) distribuidos en 15 fila de bacterias y 2 de arqueas (Fig. 1A)

(Giessen & Silver, 2017; Tracey et al., 2019). La correlación entre el ensamblaje de la encapsulina en un compartimento pequeño o grande, el tamaño del nanocompartimento y su relación con la proteína cargamento, así como su función biológica sigue siendo caracterizada. Hasta el momento, las encapsulinas descubiertas en los diferentes organismos muestran una amplia diversidad de genes de proteínas cargamento, específicamente 4 tipos: proteínas tipo ferritinas (FLPs), peroxidases, hemeritrinas (Haem) y ferredoxinas (Fer). A su vez, las encapsulinas se pueden agrupar en 4 diferentes grupos, las de geometría T=1 de 60 subunidades, las T=3 formadas por 180 subunidades y las tipo T=4 de 260 subunidades (Fig. 1B) (Nichols et al., 2017). La presencia de las diferentes proteínas cargamento dentro del nanocompartimento en estos 4 grupos de encapsulinas se puede relacionar a procesos involucrados en la mineralización del hierro, resistencia al estrés oxidativo, oxidación anaerobia del amonio y participación en el proceso de la pérdida del nitrógeno en los océanos (Fig. 1A) (Tracey et al., 2019).

El conjunto de proteínas que conforman los NCEs son: una proteína de envoltura y una o dos proteínas cargamento que se internalizan gracias a una pequeña secuencia de aminoácidos con afinidad por una cavidad al interior del nanocompartimento (*Cargo Loading Peptide*, CLP) (Fig. 1C), por ello se proponen como plataformas para aplicaciones biotecnológicas (Demchuk & Patel, 2020; Jones & Giessen, 2020) por ejemplo en el tratamiento de aguas residuales (Xing et al., 2018) o en el diseño de vacunas y presentación de antígenos (Lagoutte et al., 2018). La configuración del NCE resulta en sistemas eficientes para el secuestro de metabolitos tóxicos, centros metabólicos estables para la función enzimática, y además le confiere resistencia y estabilidad a la proteína cargamento de los factores ambientales que podrían afectar, como ataques proteolíticos o cambios fisicoquímicos que podrían dañar. Por su parte, las enzimas cargamento le confieren funciones metabólicas al organismo. Por citar algunos de los ejemplos, el NCE de *Bacillaceae bacterium* presenta enzimas cargamento como ferredoxinas, encargadas de la mineralización del hierro y protección contra el estrés oxidativo (Giessen & Silver, 2017); otro NCE con funciones fisiológicas similares es el nanocompartimento de *Sciscionella marina*, con hemeritrinas como proteínas cargamento, encargados de almacenar el hierro dentro el NCE, protegiendo así al organismo contra el estrés oxidativo y nitrosativo, así mismo la hemeritrina es protegida por la cápside proteica de agentes reductores (Tracey et al., 2019).

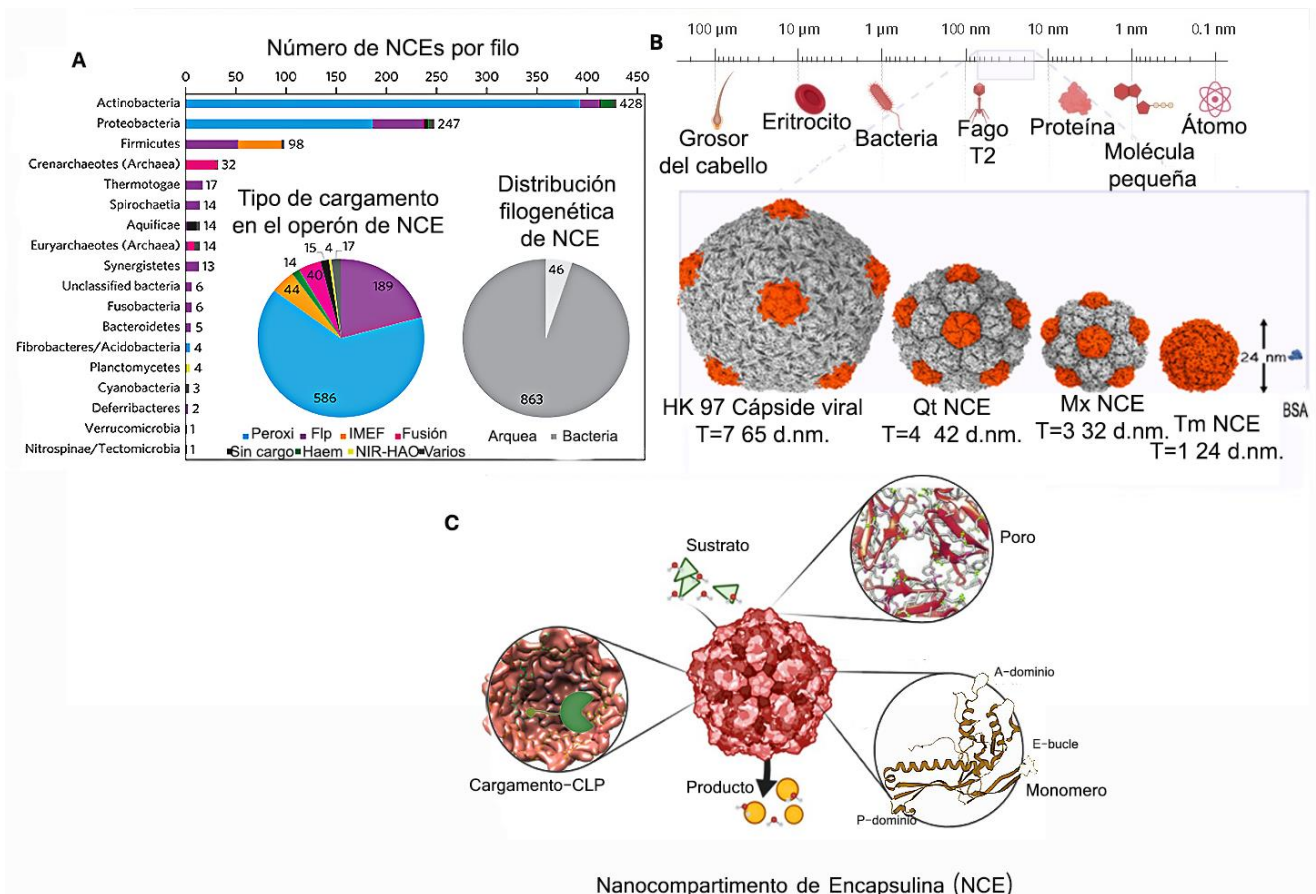


Figura 1. Nanocompartimentos de Encapsulina, sistemas de compartimentalización en bacterias y arqueas. (A) Gráfico de barras representa la distribución de las familias identificadas en fillos de bacterias y arqueas con genes de encapsulinas, el número de sistemas que pertenecen a cada tipo de carga central identificado (Peroxi: Peroxidasa, Flp: ferritinas, IMEF: Metaloproteínas de hierro prevalentes en Firmicutes, Haem: Hemeritrinas, Nir-HAO: asociación de la hidroxilamina oxidorreductasa y la nitrato reductasa, Fusión: son los genes de encapsulina unidos al gen cargamento de hidroxilamina oxidorreductasa), así como la distribución de los sistemas de encapsulina en bacterias y arqueas se muestran en las gráficas de pastel. Editado de Giessen, 2017. (B) Las encapsulinas forman compartimentos proteicos a escala nanométrica (NCE de Qt: *Q. thermotolerans*, Mx: *M. xanthus* y Tm: *T. marítima*) igual que otros sistemas de compartimento. (C) Los NCE se caracterizan por tres elementos: su monómero formador de la cápside, moléculas cargamento con la secuencia de aminoácidos CLP, y la presencia de poros en la cápside.

Por lo descrito, algunas de las encapsulinas más estudiadas, como las de *Thermotoga marítima* y *Pirococcus furiosus*, se han propuesto como centros catalíticos con enzimas cargamento heterólogas (Anexo 1, Tabla 1). En el NCE de *T. marítima* se han experimentado sistemas de entrega de fármacos anticancerígenos mediante el encapsulamiento de estos fármacos (Moon et al., 2014), generando tropismo por modificaciones en la superficie de los NCE, mientras que en el de *Brevibacterium linens* se han propuesto sistemas de encapsulamiento

de enzimas como la glucosa oxidasa y su internalización en macrófagos de mamíferos.

ESTRUCTURA PROTEICA DE LAS ENCAPSULINAS

Las encapsulinas (Enc), son codificadas por los operones de encapsulina, los cuales comprenden al gen de encapsulina (gen *enc*) correspondiente a la proteína de envoltura, seguido por los genes de las proteínas cargamento (gen *cargo*) presentes río arriba o río abajo del gen *enc* (Fig 2 A). A su vez, el gen cargamento puede presentar la secuencia codificante para el péptido de carga del cargamento (CLP) presente en la secuencia peptídica en el amino o carboxilo terminal (Giessen & Silver, 2017). En algunos operones de encapsulinas está ausente la secuencia codificante para el péptido CLP, en estos casos se ha observado la fusión del gen *enc* y el gen cargamento (Sutter et al., 2008) (Fig. 2).

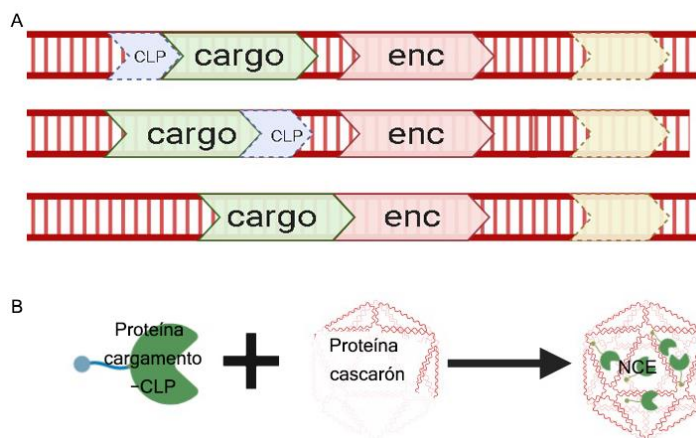


Figura 2. Diagrama de los operones de NCEs. (A) El gen codificante al péptido de carga del cargamento (CLP en azul) se puede observar en el extremo 5' o 3' del gen cargamento (*cargo* en verde), seguidos del gen de encapsulina (*enc* en rosa), excepto cuando el gen *enc* está fusionado al gen cargamento. (B) Esquema del encapsulado dependiente del CLP.

A pesar de que las encapsulinas se diversifican según las dimensiones y la estructuración espacial del NCE que forman, se han identificado similitudes estructurales con la proteína gp5 formadora de la cápside del virus HK97 (Suhanovsky & Teschke, 2015) (Fig. 3 A, B). El plegamiento característico de la gp5 y las encapsulinas se conoce como plegamiento “tipo HK97”, común entre las encapsulinas y otras proteínas formadoras de las cápsides virales (Krupovic & Koonin, 2017). El plegamiento tipo HK97 está conformado por 2 dominios conservados: el dominio A (dominio axial) y el dominio P (dominio periférico) que se extiende en estructuras no conservadas denominadas N-arm (bazo de amino terminal) y el E-loop (bucle extendido) (Duda & Teschke, 2019; Akita et al., 2007) (Fig. 3B).

Cada dominio presenta una función en la formación del icosaedro (Fig. 3 A, C). El dominio A presenta un núcleo rico en hebras β , rodeado de largas hélices α a lo largo de los bordes que interactúan con los dominios A adyacentes para formar pentámeros o hexámeros y contiene el carboxilo-terminal; modificaciones en este dominio generan fenotipos de capsómeros tubulares (Suhanovsky & Teschke, 2015; Duda & Teschke, 2019). El dominio P tiene una estructura α/β que contiene el amino-terminal, es discontinuo a nivel de estructura primaria y presenta un núcleo hidrofóbico entre las regiones de las hebras β ; esta estructura se encuentra en la periferia de los pentámeros y/o hexámeros, interactuando con el E-loop de la subunidad adyacente; modificaciones en este dominio afectan la formación del capsómero. El E-loop se observa como estructura aislada de la subunidad muy flexible que se extiende a la subunidad adyacente para formar la periferia del hexámero o pentámero, la estructura secundaria y modificaciones en esta región conducen a cambios en el tamaño de los capsómeros (Akita et al., 2007; Mchugh et al., 2014).

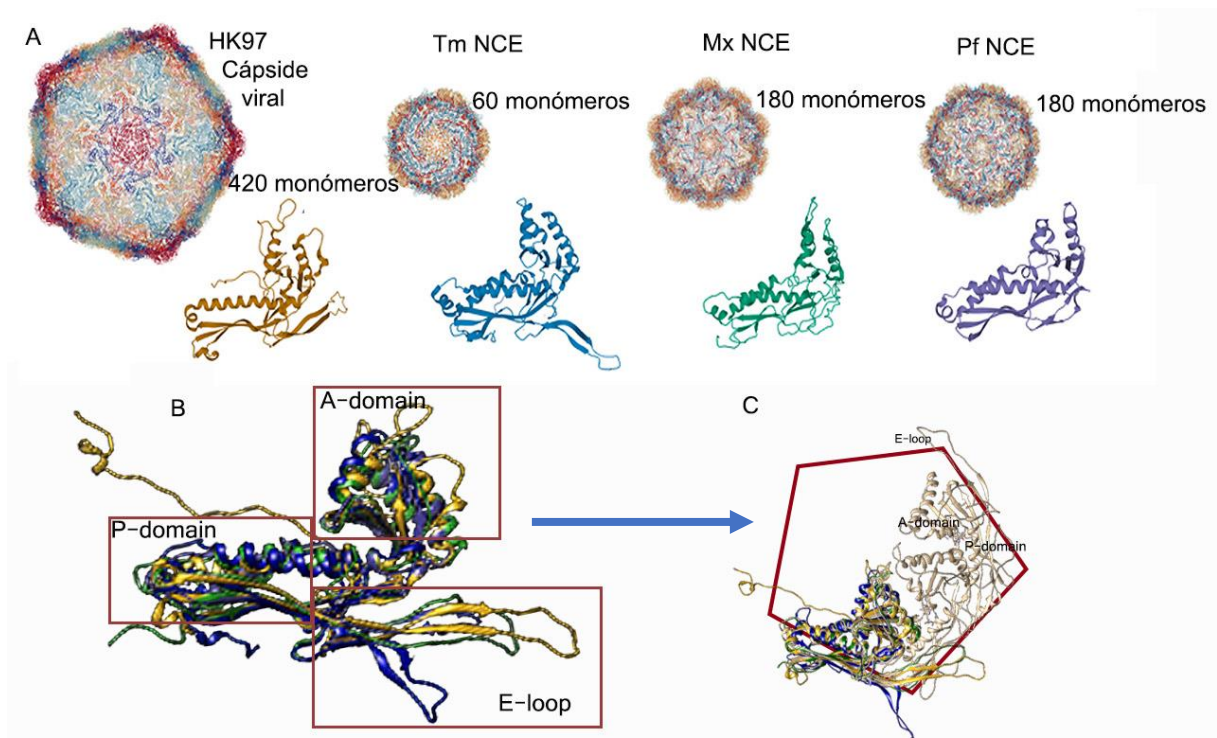


Figura 3. Comparación estructural de la subunidad con plegamiento tipo HK97 y diferencias en la formación de la cápside viral o de NCE. (A) Cápside del fago HK97 (ID-PDB: 2FT1, amarillo), NCE de *T. marítima* (TmNCE, ID-PDB: 3DKT, azul), NCE de *M. xanthus* (MxNCE, ID-PDB: 4PT2, verde), NCE de *P. furiosus* (PfNCE, ID-PDB: 2E0Z, morado). Editado de Gabashvili et al., 2020. (B) Alineamiento estructural de las subunidades. (C) Organización de los dominios en la formación del icosaedro.

Debido a que cada Enc tiene plegamiento tipo HK97, estas proteínas conservan las características antes descritas, y es interesante ver cómo variaciones sutiles en estas estructuras pueden modificar las interacciones del capsómero en el ensamble de la partícula, generando nanocompartimentos de tamaños y formas diferentes (Akita et al., 2007; Duda & Teschke, 2019) (Fig. 3).

ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS NCEs

Los NCEs están compuestos de proteínas capaces de oligomerizar y formar compartimentos similares a las cápsides icosaédricas, de tamaño y organización geométrica regido por la estructura del monómero Enc (Duda & Teschke, 2019; Rahmanpour & Bugg, 2013). En los estudios de caracterización y búsqueda de los NCEs de las diferentes especies, estos se han agrupado en 3 tipos, definidos por la relación del número de triángulos que puede presentar en la cara de un icosaedro (número de triangulación, T): las formadoras de nanocompartimentos T=1 (60 subunidades), T=3 (180 subunidades) y T=4 (240 subunidades) (Fig. 4, B) (Giessen & Silver, 2017).

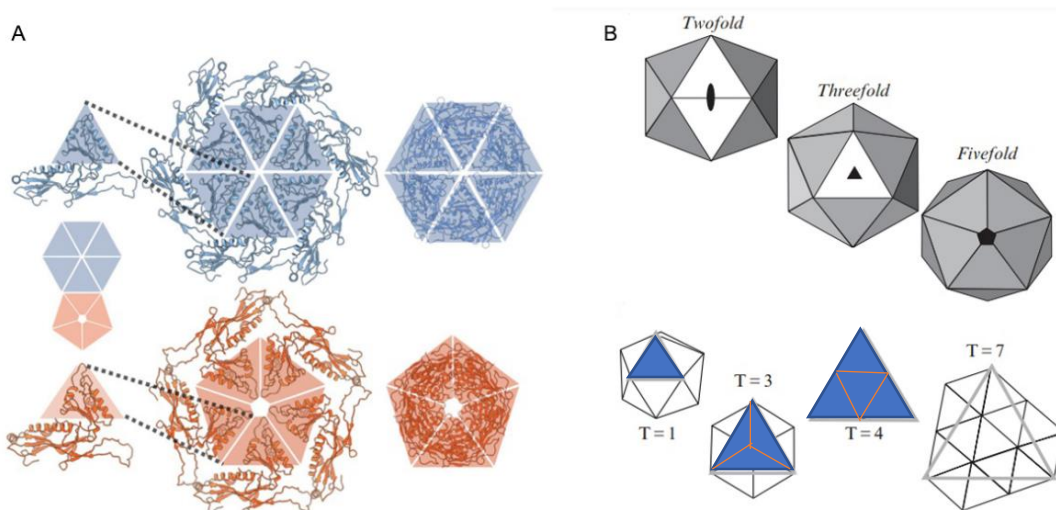


Figura 4. Organización de las subunidades en el icosaedro. (A) Esquema del hexámero que forma las caras del icosaedro (azul) y los pentámeros formadores de los vértices (naranja). Editado de Jones & Giessen, 2020. (B) En la parte superior se observan los 3 ejes de simetría que presenta el icosaedro, en la parte inferior se representa el número triangular en las caras del icosaedro.

Existen otros elementos estructurales que caracterizan a los NCEs, particularmente los poros que son necesarios para el intercambio de moléculas entre su interior y el citosol. Estos poros se pueden clasificar en 3 tipos dependiendo del eje de simetría en que aparecen: el de los ejes de simetría de orden 5 (5-fold pore), el de los ejes

de simetría de orden 3 (3-fold pore), y el de los ejes de simetría de orden 2 (2-fold pore) (Nichols et al., 2017; Jones & Giessen, 2020) (Fig. 4,B). Los poros presentan diámetros de 5-6 Å y propiedades químicas particulares que los hacen semipermeables; los de tipo 5-fold no presentan una carga parcial alrededor del poro, pero en la superficie de la cara citosólica despliegan un anillo de histidinas; los de tipo 3-fold tienen naturaleza variable dependiendo de la especie, por ejemplo el poro del NCE de *T. maritima* presenta residuos cargados positivamente alrededor de este poro (Sutter et al., 2008), mientras que los ENCs de *Quasibacillus thermotolerans* presentan poros de tipo 3-fold con residuos con cargas negativas, en cuanto a los poros de tipo 2-fold, suelen ser alargados con múltiples residuos de cargas negativas (Giessen et al., 2019; Jones & Giessen, 2020).

La función fisiológica de los NCEs puede inferirse a través del estudio de sus proteínas cargamento, las cuales varían dependiendo del organismo al que pertenece el NCE. Estos internalizan a su carga con alta especificidad gracias al CLP (Jones & Giessen, 2020). El CLP es una secuencia corta de residuos de aminoácido (~10 aa) conservada a través de las especies, presente en el extremo carboxilo o amino terminal de la proteína cargamento (Giessen & Silver, 2017; Tracey et al., 2019). Este péptido permite que la proteína cargamento se ancle a la superficie del lumen del NCE (Giessen et al., 2019; Sutter et al., 2008).

ENCAPSULINA DE *Mycoccus xanthus*

El nanocompartimento de encapsulina de *M. xanthus* (MxNCE) está formado por una encapsulina de cubierta (EncA, 32.5 kDa) y puede contener 3 proteínas cargamento (EncB, 17 kDa; EncC, 13 kDa; EncD, 11 kDa). A partir de 180 subunidades repetidas de EncA se forma una estructura icosaédrica de 32 nm de diámetro, y posee un plegamiento similar al de la proteína gp5 del bacteriófago HK97 (Fig. 5). De manera natural, la encapsulina de *M. xanthus* encapsula a las proteínas EncB, EncC y EncD a través de su CLP localizado en el extremo C-terminal de estas proteínas, que consiste en solo 8 residuos de aminoácido (LTVGSLRR) (Lau et al., 2018). El modo en que el CLP interacciona con las proteínas del cascarón del NCE se desconoce.

La encapsulina A (EncA) se encuentra formada por 3 dominios conservados: dominio periférico (P), dominio axial (A) y un bucle alargado (E). Cada dominio presenta una función en la formación de la proteína de cubierta. El dominio P consiste en una estructura α/β , contiene el N-terminal y es discontinuo a nivel de estructura primaria. Además, presenta un núcleo hidrofóbico entre las regiones de las hebras beta. El bucle E es el responsable de la formación de contactos entre plegamientos simétricos. El dominio A forma estructuras compactas que consisten en tres segmentos de hélices α y cinco hebras β , y contiene al extremo C-terminal, este dominio conecta con el resto de las subunidades y media todos los contactos

de los cinco pliegues de la interfaz. Los extremos N- y C-terminales de la capsulina A se encuentran dentro y fuera de la superficie del MxNCEs, respectivamente (McHugh et al., 2014; Duda & Teschke, 2019).

EncA presenta similitud con otras proteínas formadoras de NCEs. Un análisis de las secuencias de EncA muestra un 24% de identidad y 43% de similitud con la secuencia de la capsulina de *T. maritima* (Giessen & Silver, 2017).

Las subunidades EncB y EncC poseen dominios tipo ferritina (FLP), que le permiten al NCE de *M. xanthus* encapsular al hierro en forma de ferrihidrato en cantidades hasta 10 veces mayores que en las ferritinas (McHugh et al., 2014).

Los múltiples poros que presenta el MxNCE tienen un diámetro de 5 Å, estos poros formados por los ejes de simetría de orden 5 permiten la entrada de iones como Fe²⁺ (Sigmund et al., 2018).

La importancia de las proteínas cargamento radica en la función fisiológica de los nanocompartimentos y el ensamblaje *in vivo* de estos. Al explorar la funcionalización de NCEs, se encontró que la disrupción o mutación de las subunidades que forman estos nanocompartimentos provoca la pérdida de la habilidad de secuestrar hierro, y las células mueren en estado de estrés oxidativo (McHugh et al., 2014; Kim et al., 2019).

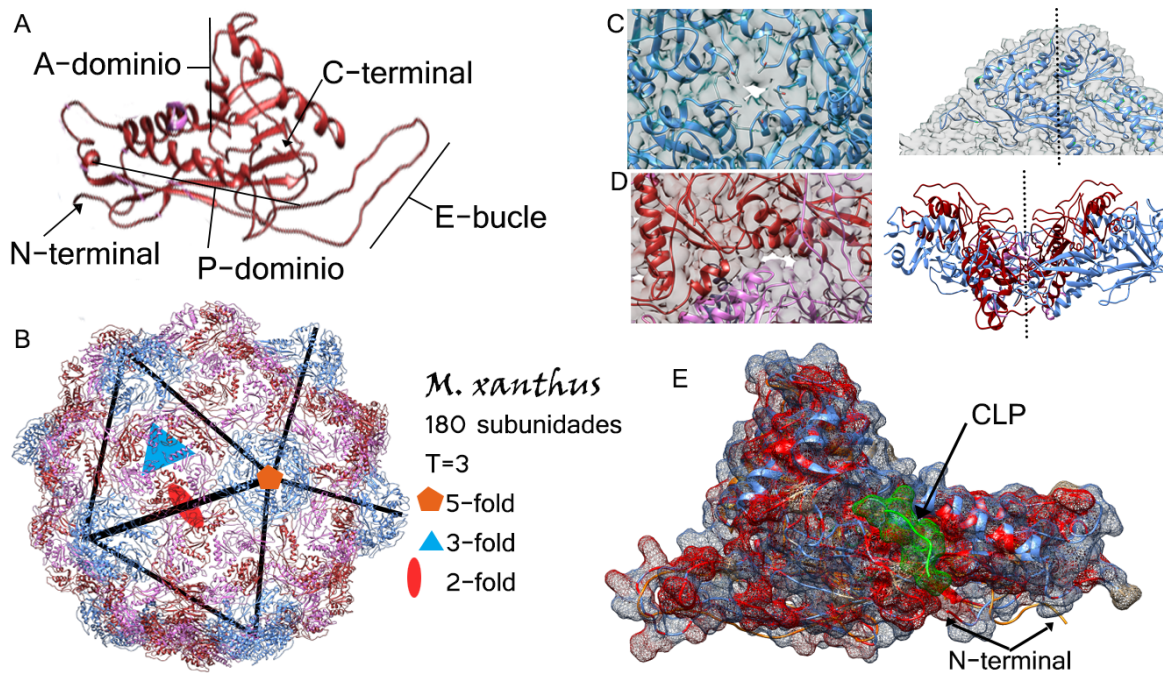


Figura 5. Nanocompartimento de encapsulina de *M. xanthus* (MxNCE). (A) Monómero de EncA, los extremos N- y C-terminales están indicados con flechas (ID-PDB: 4PT2). (B) Organización de las subunidades en la formación del icosaedro con la marca de los ejes de simetría. (C, D) Poros formados en el nanocompartimento en los ejes de simetría de orden 5 y 2 respectivamente. (E) Alineamiento estructural de EncA y Enc de *Q. thermotolerans* (ID-PDB: 6NJ8); las superficies con carácter hidrofóbico se marcan en rojo y, en verde, el CLP de *Q. thermotolerans*.

Considerando las propiedades y sistemas propuestos para las encapsulinas de distintos organismos en el área biotecnológica, en el presente trabajo se utilizó la proteína de envoltura del NCE del organismo *M. xanthus* (MxNCE) para formar nanopartículas cargadas con moléculas heterólogas *in vitro* e *in vivo*.

LAS ENCAPSULINAS EN LA BIONANOTECNOLOGÍA

La bionanotecnología se encarga del estudio de elementos existentes en la naturaleza para el desarrollo de nuevos dispositivos a escalas nanométricas (10-100 nm) con usos biológicos o bioquímicos en biomedicina, agricultura, biotecnología, medio ambiente, etc. (Kayser & Lemke, 2010; Ren et al., 2019). Los nanocompartimentos de proteínas (PNCs) como las encapsulinas (NCEs) podrían ser la solución a algunos de los retos presentes en la bionanotecnología (Dubach, 2019). Los principales retos en el área de la bionanotecnología con los materiales convencionales (nanopartículas de polímeros, nanosuspensiones y cristales, nanopartículas lipídicas, nanotubos o nanoalambres) son la carga de la partícula,

las propiedades de la superficie y la hidrofobicidad relativa, su absorción preferente por algún órgano o tejido, la monodispersidad de la partícula, la forma simétrica, el autoensamble y la fácil producción, además de un encapsulamiento estocástico del cargamento, biocompatibilidad, y la protección del cargamento (Demchuk & Patel, 2020).

Con los estudios sobre la estructura, bioquímica y función de los NCEs, así como sobre la manipulación y modificación de las proteínas cascarón y cargamento, se han desarrollado múltiples sistemas biotecnológicos para su uso en diferentes áreas (Jones & Giessen, 2020). A continuación explicaremos algunas de las ventajas tecnológicas que los NCEs pueden presentar en comparación con los sistemas nanotecnológicos existentes como los nanotubos y perlas de sílice (Raeeszadeh-Sarmazdeh et al., 2016; Ren et al., 2019).

Dadas las propiedades ya descritas de las encapsulinas, cada subunidad representa un área superficial para la presentación de moléculas de interés ya que su naturaleza proteica los hace partículas biocompatibles capaces de proteger al cargamento de los factores externos (Fig. 6) (Diaz, Care, & Sunna, 2018). Así, las encapsulinas son proteínas modelo para el desarrollo de nanocompartimentos y una posible solución para el desarrollo de nanoacarreadores de fármacos, producción de vacunas, generación de catalizadores, etc. (Demchuk & Patel, 2020; Student & Date, 2019).

Además de la proteína cascarón, la interacción de los NCEs con la secuencia peptídica conservada permite encapsular proteínas sin interferir con la naturaleza de la proteína siempre que sea estable para realizar el encapsulamiento (Künzle et al., 2018). Así, este mecanismo de encapsulamiento característico de los NCEs puede ayudar a superar retos biotecnológicos, como la poca eficiencia del encapsulamiento, solubilidad del cargamento, especificidad y concentración de la carga, e incluso permitir el encapsulamiento de más de una molécula heteróloga en cada NCE (Raeeszadeh-Sarmazdeh et al., 2016) .

En estudios recientes se ha buscado manipular los poros con la finalidad de permitir un mejor intercambio de moléculas entre el interior y exterior de los NCEs. Con esta manipulación sería posible la construcción de nanoreactores con características y capacidades diferentes para enfrentar problemas de catálisis múltiple (Williams et al., 2018).

La diversidad de los PNC abarca un extenso rango de aplicaciones potenciales (Anexo 1), a su vez las características de los NCEs que representan una ventaja en la nanobiotecnología también pueden suponer desventajas para ciertas aplicaciones, como su inmunoreactividad por la presencia de estructuras repetidas, su incapacidad para cruzar membranas (en particular la barrera hematoencefálica y el tracto gastrointestinal), la formación de poros semipermeables sin el libre intercambio de moléculas, su alta resistencia al desensamble en condiciones fisiológicas y su falta de tropismo. Sin embargo, la manipulación de los NCEs podrá generar estructuras variables que, dependiendo de su finalidad, pueden encontrar funciones y actividades en diferentes campos (Anexo 1) (Giessen, 2016).

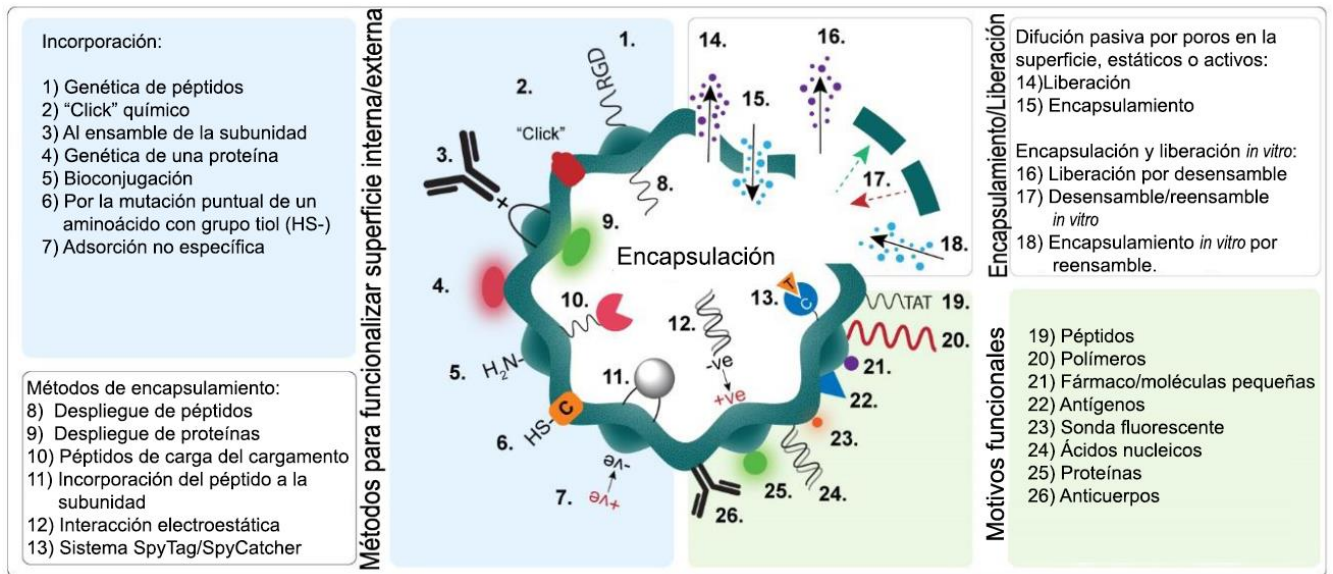


Figura 6. La ilustración muestra las múltiples modificaciones para funcionalizar y encapsular en sistemas de nanocompartimentalización. Editado de Diaz et al., 2018

ENSAMBLES *IN VITRO* E *IN VIVO* DE NCEs

A través de varios trabajos de ingeniería de encapsulinas y caracterización de éstas, se ha demostrado que estas proteínas podrían ser un nanosistema multifuncional a través de la formación de NCEs para el envío o acarreo de moléculas (Díaz et al., 2018; Giessen, 2016). Debido al reciente descubrimiento de estos nanocompartimentos, la información y trabajos acerca de la encapsulina de *M. xanthus* aún son pocos. En la Tabla 1 se muestran algunos de los trabajos publicados en años recientes acerca de la funcionalización y caracterización de la encapsulina de *T. maritima*. Las contribuciones de estos trabajos son de importancia para el presente estudio debido a la similitud estructural que presentan las subunidades formadoras de la coraza del nanocompartimento de encapsulina de *T. maritima* y *M. xanthus*.

En este trabajo, estudiamos el desensamble y reensamble de la proteína EncA de *M. xanthus* en NCEs. Expresamos esta proteína en un sistema de *E. coli* y la purificamos. Estudiamos su estabilidad en diversas condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica, y posteriormente estudiamos su reensamble *in vitro*, así como el encapsulamiento de una proteína modelo.

Tabla 1. Estudios realizados con capsulinas de diferentes organismos.

Organismo	Trabajo	Contribución	Ref.
<i>M. xanthus</i>	Se caracterizó por criomicroscopia electrónica (Cryo-EM) la estructura y las proteínas cargamento del MxNCE, además se estudió la función fisiológica de esta estructura en el organismo hospedero.	Se demostró la expresión de la capsulina en el sistema de <i>E. coli</i> , la caracterización de la estructura reveló información básica para la manipulación de esta capsulina.	Mchugh et al., 2014
Varios	Se realizó un análisis bioinformático y filogenético en función de <i>clusters</i> de genes de capsulinas, en procariontes y arqueobacterias.	Se encontró la existencia de varios sistemas de compartimentalización, la presencia de CLPs para las proteínas cargamento y similitud estructural entre las capsulinas de <i>M. xanthus</i> y <i>T. maritima</i> .	Giessen & Silver, 2017a
<i>M. xanthus</i>	Se expresó la proteína EncA en células de <i>S. cerevisiae</i> , además se coexpresaron proteínas heterólogas unidas al péptido CLP.	La expresión y autoensamble de EncA es posible en células eucariontes, además el capsulamiento de proteínas heterólogas es posible con el péptido CLP.	Lau et al., 2018
<i>T. maritima</i>	Expresaron la capsulina de <i>T. maritima</i> en <i>E. coli</i> junto con una proteína cargamento heteróloga al de la capsulina de <i>T. maritima</i> , GFP, desensamblaron y reensamblaron la capsulina junto a la proteína cargamento bajo diferentes condiciones fisicoquímicas.	Se demostró que el péptido CLP de <i>T. maritima</i> puede funcionar para proteínas heterólogas, se puede ensamblar <i>in vitro</i> y que la proteína puede reensamblarse después de haber sido desensamblada.	Cassidy-Amstutz et al., 2016
<i>T. maritima</i>	Se expresó la capsulina de <i>T. maritima</i> en <i>E. coli</i> , se crearon 4 mutantes de la subunidad que forma la capsulina donde a la secuencia nativa se le agregaron péptidos de cápsidas virales que le permiten mejorar el ensamble de NCEs, otra mutante tenía como proteína cargamento la GFP.	Evidencia la expresión de capsulinas heterólogas en el sistema de <i>E. coli</i> , que la modificación en regiones específicas de la capsulina mejora el ensamble de esta y que puede ensamblarse con proteínas cargamento heterólogas.	Lagoutte et al., 2018
<i>T. maritima</i>	Se realizaron dos mutaciones a las subunidades que conforman el NCE, una de ellas provee a la capsulina estabilidad térmica, mientras que la en la otra agregaron en el exterior un péptido de reconocimiento específico para células de carcinoma hepático.	Aporta información de pequeñas mutaciones que pueden estabilizar su estructura, la capsulación de la proteína cargamento y las aplicaciones de estos nanosistemas a través de modificaciones en la estructura.	Moon et al., 2014

HIPÓTESIS

La proteína EncA de *M. xanthus* tiene la información para su plegamiento y asociación en MxNCEs *in vivo*, por lo que este proceso se puede replicar *in vitro* bajo condiciones fisicoquímicas favorables. Bajo tales condiciones, será posible encapsular biomoléculas de interés que permitan ampliar el potencial biomédico y biotecnológico de estas partículas.

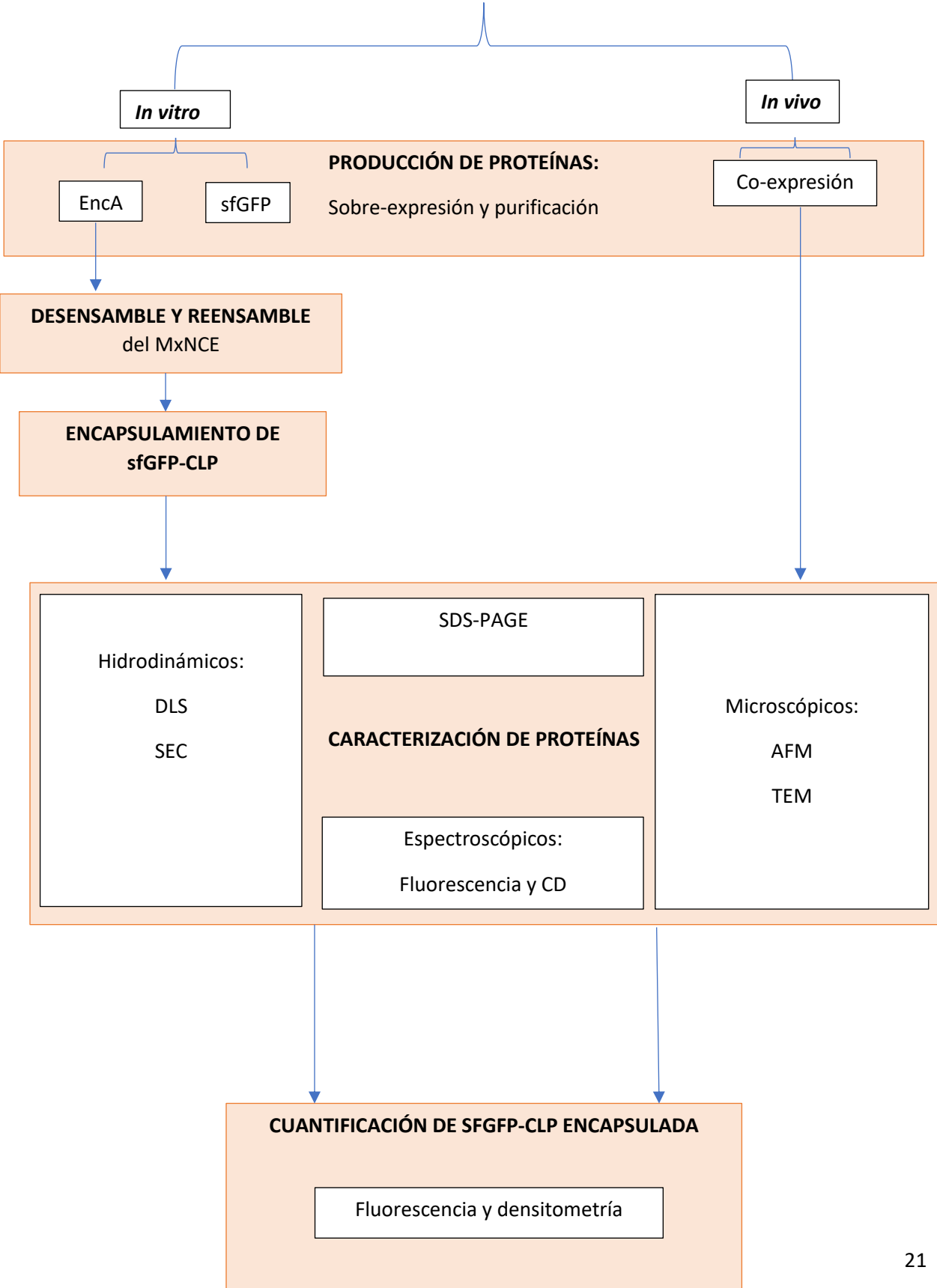
OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de factores fisicoquímicos en el desensamble y reensamble *in vitro* de la proteína EncA de *M. xanthus* en MxNCEs, y evaluar el encapsulamiento de proteínas heterólogas.

Objetivos particulares

- Sobrexpresar y purificar la proteína de EncA de *M. xanthus*.
- Evaluar el efecto de distintos agentes caotrópicos (Urea, GuHCl, Temperatura, pH) en la estabilidad de la encapsulina y el ensamble de MxNCEs.
- Evaluar las condiciones óptimas para ensamblar MxNCEs (Temperatura, pH y chaperonas químicas).
- Estudiar el encapsulado de proteínas heterólogas de interés dentro de MxNCEs *in vitro* e *in vivo*, así como la eficiencia de estos procesos.

ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



MATERIAL Y METODOLOGÍA

Los reactivos utilizados, en la metodología posteriormente descrita, se enlista a continuación:

- Acetato de Potasio (Sigma)
- Ácido acético glacial (Sigma)
- Ácido bicinconínico (BCA)Sigma-Aldrich
- Ácido clorhídrico (Sigma)
- Agar LB (Luria Bertani, Difco)
- Ampicilina (Sigma-Aldrich)
- Azul brillante R-250Sigma
- Clorhidrato de Guanidina (Sigma)
- Cloruro de Cesio (CsCl) (Sigma)
- Cloruro de Potasio (KCl) (Sigma)
- Cloruro de Sodio (NaCl) (Sigma)
- Dodecilsulfato de Sodio (SDS) (Sigma)
- Fosfato de Potasio monobásico (KH_2PO_4) (Sigma)
- Fosfato de Sodio dibásico (Na_2HPO_4) (Sigma)
- Isopropil-1-tio-D-galactopiranosido (IPTG) (Sigma)
- Imidazol (Sigma)
- L-Arginina (Sigma)
- Metanol (Química Delta)
- Membrana para diálisis (Sigma)
- Tris-HCl (Sigma)
- Urea (Sigma)
- 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich)
- Rejillas de formvar para TEM
- HiTrap® HP 5 mL (GE Healthcare)
- Columna de filtración Superdex® 200 pg (GE Healthcare)

Soluciones amortiguadoras utilizadas:

- **Amortiguador de fosfatos, pH 7.4:** 137mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄.
- **Solución amortiguadora para lavados:** 0.9% de NaCl (p/v) en agua destilada.
- **Solución amortiguadora A:** amortiguador de fosfatos, 35 mM de Imidazol, pH7.4
- **Solución amortiguadora B:** amortiguador de fosfatos, 500 mM de Imidazol, pH7.4
- **Solución amortiguadora A₂:** amortiguador de fosfatos, 45 mM de Imidazol, pH7.4
- **Amortiguador de acetatos:** 200 mM de ácido acético, 250 mM de acetato.

Equipos usados:

- Agitador orbital (Thermo Scientific)
- Balanza analítica (Sartorius)
- Espectrofotómetro (CARY 400 Varian)
- FPLC (ÄKTA GE Healthcare Life Science)
- Thermomixer (Eppendorf)
- Ultracentrífuga (Beckman)
- Zetataiser μ V (Malvern Instruments)
- HPLC (Waters 600)
- Bio-Rad MicroPulser TM
- Chirascan (Applied Photophysics ©)
- Espectrofluorómetro PC1 (ISS©)

Proteínas recombinantes

La proteína EncA recombinante se produjo en células transformantes de *E. coli* BL21(DE3) a partir de la expresión del gen *encA* insertado entre los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI* del vector de expresión pET22b (+) (Novagen) (Fig.7).

MPLEPHFMPDFLGAENPLREEEWARLNETVIQVARRSLVGRRILDIYGPLGAGVQTVP
YDEFQGVSPGAVDIVGEQETAMVFTDARKFKTIPIIYKDFLLHWRDIEAARTHNMPLDV
SAAAGAAALCAQQEDELIFYGDARLGYEGLMTANGRLTVPLGDWTSPGGGFQAIVEATR
KLNEQGHFGPYAVVLSPRLYSQLHRIYEKTGVLEIETIRQLASDGVYQSNRLRGESGVV
VSTGRENMDLAVSMDMVAAYLGASRMNHPFRVLEALLLRIKHPDAICTLEGAGATERRL
EHHHHHH

Figura 7. Secuencia de aminoácidos de la proteína EncA. En azul se marca la etiqueta de Histidinas (6xHis) en el extremo carboxilo terminal de la secuencia.

Las proteínas cargamento de los NCEs presentan el péptido CLP. En este trabajo, se utilizó como proteína cargamento heteróloga, una variante de la proteína verde fluorescente llamada *superfolder* (sfGFP), la cual tiene la propiedad de plegarse adecuadamente y ser estable. Ésta a su vez se fusionó a través de su extremo carboxilo con el CLP de *M. xanthus* para su internalización en el MxNCE. La proteína sfGFP-CLP se produjo en células transformantes de *E. coli* BL21(DE3) a partir de la expresión del gen *sfgfp-clp* insertado entre los sitios de restricción *NdeI* y *EcoRI* del vector de expresión pET28a (Novagen). En el sitio de *NdeI* se fusionó con una secuencia de DNA que codifica para una etiqueta de 6 histidinas (6xHis), seguido de un sitio de corte para trombina en el extremo amino terminal (Fig. 8). Las secuencias de los genes *encA* y *sfgfp-clp* se optimizaron para su expresión en *E. coli* y se sintetizaron químicamente (Gnene Universal Inc.).

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMRKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATN
GKLTLLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTI
SFKDDGTYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNFNShNVYITADKQ
KNGIKANFKIRHNVEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSVLSKDPNEKRD
HMLLEFVTAAGITHGMDELYKGGSGGSGGSLTVGSLRR

Figura 8. Secuencia de aminoácidos de la proteína sfGFP-CLP. En azul se marca la etiqueta de Histidinas (6xHis), en rojo el sitio de trombina y en verde el péptido de proteínas cargamento (CLP).

TRANSFORMACIÓN DE *E. coli* BL21(DE3)

1. Se resuspendieron los plásmidos deshidratados en 10 μ L de agua desionizada estéril.
2. Se descongelaron las células quimiocompetentes de *E. coli* BL21(DE3) por 20 min en baño de hielo. Para la obtención de células quimiocompetentes revisar el anexo 2.1.
3. Se agregaron 2 μ L de la solución del plásmido y se mezclaron suavemente; se incubaron en hielo durante 30 min.
4. Se incubaron a 42 °C por 45 s en un baño de agua y se regresaron al baño de hielo por 2 min.
5. Se transfirieron las células a un tubo eppendorf con capacidad de 1.5 mL y se adicionó 1 mL de medio LB y se incubó por 1 h con agitación orbital a 37 °C y 250 r.p.m.
6. Se sembraron 50 μ L estas células en placas Petri con agar LB adicionadas del antibiótico correspondiente. Las placas se incubaron a 37 °C por 12 h.
7. Al día siguiente se procedió a seleccionar colonias aisladas para verificar la sobreexpresión de las proteínas de interés.

SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA EncA

La sobreexpresión de la proteína EncA se realizó en *E. coli* BL21(DE3) transformada con el vector de expresión pET22b con el gen *encA* bajo control del promotor T7, que en presencia del inductor artificial Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) permite la transcripción del gen *encA*.

Se realizaron modificaciones a la metodología descrita por Orner (2015) y McHugh y col. (2014) para la sobreexpresión de EncA:

1. Se preparó un preinóculo en 10 mL de medio LB-amp (LB adicionado con 50 μ g/mL de ampicilina) a partir de una sola colonia. Se incubó el pre-inóculo a 37 °C en agitación a 220 r.p.m. durante toda la noche.
2. Se inoculó un matraz con capacidad de 500 mL que contenía 200 mL de medio LB-amp, para ello se adicionaron los 10 mL del pre-inóculo obtenido previamente. Se incubó durante 4 h a 37 °C en agitación orbital a 220 r.p.m.
3. Se tomó una alícuota de 20 μ L, para posteriores análisis por SDS-PAGE.
4. Al inicio de la fase exponencial (DO_{600} de 0.6 a 0.8), se agregó IPTG a una concentración final de 0.6 mM. Se mantuvieron las condiciones de incubación durante 6 h más.
5. Se cosechó la biomasa por centrifugación a 5000 r.p.m. por 20 min a 10 °C.
6. Se resuspendió la biomasa en 20 mL de solución amortiguadora para lavados.
7. Se tomó una alícuota de 20 μ L y se por SDS-PAGE junto con la alícuota tomada anteriormente.
8. Se repitieron los pasos 5 y 6 para colectar la biomasa y se mantuvo a -70 °C hasta su uso.

SOBREENPRESIÓN DE SFGFP-CLP

El sistema de sobreexpresión de la proteína sfGFP-CLP fue *E. coli* BL21(DE3) transformantes con el vector de expresión pET28a con el gen *sfgfp-clp*, también bajo el control del promotor T7 inducible por IPTG.

Se verificó la sobreexpresión de las proteínas por una serie de ensayos empleando 10 mL de medio de cultivo LB-Kan (LB adicionado de 50 µg/mL de kanamicina) e IPTG como agente inductor a diferentes concentraciones (0.2, 0.4 y 0.6 mM). Después se confirmó la presencia de sfGFP-CLP mediante un gel SDS-PAGE y se determinó la concentración del inductor para su uso en la producción de proteína.

1. Se preparó un pre-inóculo (10 mL de medio LB-Kan) a partir de una colonia. Se incubó el pre-inóculo a 37 °C en agitación a 220 r.p.m. durante toda la noche.
2. Se inoculó un matraz con capacidad de 500 mL que contenía 200 mL de medio LB-Kan, para ello se adicionaron los 10 mL de pre-inóculo. Se incubó durante 4 h a 37°C en agitación orbital a 220 r.p.m.
3. Se tomó una alícuota de 20 µL para posteriores análisis por SDS-PAGE.
4. Al inicio de la fase exponencial (DO_{600} de 0.6), se agregó IPTG a una concentración final de 0.2 mM. Se mantuvieron las condiciones de incubación durante 6 h más.
5. Se obtuvo la biomasa por centrifugación a 5000 r.p.m. por 20 min a 10 °C.
6. Se resuspendió la biomasa en 20 mL de solución amortiguadora para lavados.
7. Se tomó una alícuota de 20 µL y se analizó por SDS-PAGE junto con la alícuota tomada antes de la inducción.
8. Se repitieron los pasos 5 y 6 para la obtención de biomasa y se mantuvieron a -70 °C hasta su uso.

PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Las proteínas EncA y sfGFP-CLP están provistas de una etiqueta de 6xHis en el extremo carboxilo y en el extremo amino terminal, respectivamente. Esta característica permitió su purificación mediante cromatografía de afinidad. La columna empleada para dicho propósito fue la columna preempacada His-Trap de 5 mL (GE), que en su matriz posee iones inmovilizados de Níquel, metal que presenta afinidad por los residuos de Histidina presentes en las proteínas.

La purificación de EncA se realizó en el equipo ÄKTA Purifier (GE) a un flujo de 2 mL/min y el gradiente de elución de 35 a 500 mM de imidazol en amortiguadores de fosfatos a pH de 7.4, soluciones amortiguadoras A y B.

La purificación de sfGFP-CLP se realizó en el equipo ÄKTA Purifier (GE) a un flujo de 2 mL/min y gradiente de elución de 45 a 500 mM de imidazol en amortiguadores de fosfatos a pH de 7.4, soluciones amortiguadoras A₂ y B.

Las fracciones de elución se colectaron y se analizaron por SDS-PAGE para establecer las fracciones con la proteína de interés.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y PUREZA DE EncA y sfGFP-CLP

La concentración de las proteínas EncA y sfGFP-CLP, purificadas por la metodología descrita, se determinó su mediante el método del ácido bicinconínico (BCA). Este es un método colorimétrico que se basa en dos reacciones, primero el Cu^{2+} se reduce a Cu^{1+} por los enlaces peptídicos presentes en las proteínas, y después el color morado, que absorbe a 562 nm, es generado por las moléculas de ácido bicinconínico al quelar al ion Cu^{1+} . La absorbancia a 562 nm que presenten las muestras será proporcional a la concentración de la proteína. Se requiere preparar una curva patrón empleando las soluciones que se indican en el anexo 2.2. La curva patrón y las muestras deben prepararse simultáneamente, bajo las mismas condiciones, y todas las determinaciones se hacen por triplicado.

1. En tubos eppendorf (1.5 mL) se prepararon las soluciones que correspondían a las muestras y a cada uno de los puntos de la curva según se indica en el anexo 2.2.
2. Cada tubo se agitó en el vortex por 10 s y se incubaron a 37 °C durante 35 min.
3. Después del periodo de incubación, se colocaron todos los tubos en baño de hielo para detener el progreso de la reacción.
4. Se determinó la absorbancia que presentan los puntos de la curva y las muestras a una longitud de onda de 562 nm. Se empleó el espectrofotómetro CARY 400 (Varian).
5. Con los valores obtenidos se construyó la curva patrón y por interpolación se determinó la concentración de las muestras.
6. La pureza de EncA y sfGFP-CLP se determinó mediante el programa computacional NIH ImageJ. Este programa cuenta con una herramienta que permite generar un perfil gráfico de la proporción que guardan las diferentes proteínas presentes en un gel de poliacrilamida, por lo que se pudo asociar la intensidad de las bandas en el gel de poliacrilamida con su abundancia relativa.

CARACTERIZACIÓN DE MxNCES

Métodos hidrodinámicos:

DLS

La técnica de caracterización por dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés) se utiliza para la determinación del tamaño promedio y la distribución de tamaños de partículas en solución o dispersión, mediante un haz de luz que atraviesa la muestra y se dispersa por las partículas suspendidas en ésta. Las medidas de diámetros hidrodinámicos promedio suspendidas en la muestra las evalúa el equipo.

El protocolo para las lecturas fue el siguiente:

1. La proteína EncA purificada se analizó en el equipo Zetasizer μ V. La suspensión de los MxNCEs de EncA se encontraban en amortiguador de fosfatos, pH 7.4, a una concentración de 0.5 mg/mL y se filtraron con una membrana de 0.22 μ m.
2. Se ajustaron los parámetros de lectura, dependiendo del amortiguador en el que se encontraba la EncA. En amortiguador de fosfatos el índice de refracción y la viscosidad se fijaron como 1.33 y 1.003 cP, respectivamente.
3. Se obtuvieron poblaciones de partículas promedio de 5 ciclos de lecturas con 10 lecturas cada ciclo, a cada una de las muestras.

Métodos microscópicos:

Microscopía de Fuerza Atómica

La microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés) es una herramienta sensible a la superficie, poderosa para determinaciones topográficas, capaz de obtener imágenes de muestras biológicas con una resolución nanométrica como los virus y las macromoléculas. Las muestras se pueden analizar en estados nativos mediante el escaneo con una sonda con punta afilada, apoyada en un microcantiléver montado en un transductor piezoeléctrico, que se desplaza

horizontalmente sobre una superficie y que registra las fuerzas de interacción entre los átomos de la sonda y la superficie a través del cambio de posición del cantiléver, generando un mapa tridimensional de la superficie (Allison, et al., 2002; Silva, 2005). Las ventajas del AFM es que no requiere de varios pasos para la preparación de la muestra, el único requisito es anclar a las proteínas firmemente a una superficie de soporte.

El protocolo para el análisis de los MxNCEs por AFM fue el siguiente:

1. Las muestras que se analizaron por esta técnica se filtraron utilizando unidades de Millipore con poros de 0.22 μm .
2. Se colocó 10 μL de la solución de la muestra [0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$] en la superficie de un disco de mica grado 32V1 de 12 mm de diámetro (Ted Pella Inc.).
3. Posteriormente la mica húmeda se secó en condiciones de presión reducida a 25 $^{\circ}\text{C}$.
4. Se limpió la mica, de los cristales de la solución amortiguadora, con 500 μL agua desionizada, filtrada con membranas con poros de 0.22 μm . Finalmente se desecaron las micas bajo las mismas condiciones anteriores.
5. La mica fue adherida a un disco magnético. Los datos se adquirieron con el microscopio de sonda de barrido Innova™ (Veeco Instruments Inc.) operado con el software NanoScope Analysis 1.5. El microscopio cuenta con una sonda de barrido de alta resolución HiRes-C19/Cr-Au (MikroMasch). Estas sondas tienen un radio de punta de ~ 1 nm, constantes de fuerza promedio de 0.5 N/m y una media de frecuencias de resonancia de 65 kHz. Todas las imágenes fueron generadas utilizando el modo táctil.
6. Las imágenes se analizaron con el software Gwyddion 2.58.

Microscopia Electrónica de Transmisión

La microscopia electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) es una herramienta popular y relativamente simple que puede ofrecer una visualización directa de los nanomateriales con alta resolución. Esto gracias al uso de un haz de

electrones dirigido hacia una muestra ultrafina a través de un tubo de vacío. Una parte de los electrones rebotan o son absorbidos por el objeto y otros lo atraviesan formando una imagen aumentada de la muestra (D. B. Williams & Carter, 2009). La consideración importante es que la imagen final solo se puede formar utilizando aquellos electrones que pasan a través de la apertura del objetivo, por ello debemos considerar en detalle los posibles mecanismos de contraste que determinarán si una característica aparecerá brillante u oscura en una imagen. Cuando se utiliza TEM para la observación de compuestos biológicos es necesario un tratamiento de tinción negativa. La tinción negativa se basa en el principio de que los iones de tinción son repelidos por los grupos cargados de la muestra y se asientan junto a las moléculas biológicas (Cao et al., 2011). Estos átomos pesados aumentan la dispersión de electrones y mejoran el contraste de amplitud de las moléculas biológicas. El ácido fosfotúngstico (PTA,) proporciona una tinción negativa típica que generalmente funciona a un pH neutro.

El protocolo para el análisis supramolecular de los MxNCEs por TEM fue el siguiente:

1. Se aplicaron 10 μL de la solución muestra [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$], filtrada previamente con una membrana de 0.22 μm , sobre una rejilla de cobre (300 MESH), revestida del material formador, durante 1 min para la absorción de la muestra.
2. Posteriormente el exceso de la solución se extrajo del borde de la rejilla por la cuña de un papel de filtro.
3. Se adicionaron 10 μL del medio de contraste (PTA al 3% pH=7) y se dejó durante 1 min.
4. Una vez transcurrido el tiempo, se retiró el exceso de volumen, como en el paso 2 y se dejó secar a temperatura ambiente hasta su visualización en el TEM, ~12h.
5. El análisis de las imágenes se realizó con el software ImageJ.

DETERMINACIÓN DE CONDICIONES FISICOQUÍMICAS PARA EL DESENSAMBLE DE MxNCEs

Para estudiar el desensamble de los MxNCEs se hicieron modificaciones a las condiciones fisicoquímicas iniciales, como cambios de pH, adición de agentes desnaturalizantes, y cambios de temperatura. Los cambios estructurales se siguieron por DLS. Para determinar el desensamble de MxNCEs purificados se evaluaron las siguientes condiciones: temperatura (2, 4, 30, 40 y 60 °C), pH (3, 4, 6, 7, 8, 10 y 11), concentraciones de agentes caotrópicos como Urea (U) (2, 3, 4 y 5 M) y cloruro de guanidinio (HClGnd) (2, 3, 4, 5 y 6 M). Se evaluó, por DLS, el tamaño de partícula resultante en todas las condiciones.

Para el desensamble por temperatura, en microtubos con capacidad de 1.5 mL se colocó 1 mL de EncA a una concentración de 0.4 mg/mL en amortiguador de fosfatos. Los tubos se incubaron a diferentes temperaturas durante 30 min en un Thermomixer en agitación a 300 r.p.m.

Para los desensambles en diferentes condiciones de pH se realizó una diálisis con diferentes amortiguadores: para los valores de pH de 4 se utilizó amortiguador de acetatos 250 mM, para pH 7 y 8 se usó amortiguador de fosfatos 2 mM, y para pH 10 y 11 se utilizó amortiguador de glicina 200 mM.

Los desensambles con compuestos caotrópicos se realizaron a partir de diluciones concentradas de U o HClGnd hasta diluirlas a la concentración deseada con la solución de la proteína EncA. Se dejó llegar al equilibrio durante 2 h para HClGnd y 12 h para U. Se evaluó el tamaño de partícula resultante para todas las condiciones por DLS.

CARACTERIZACIÓN DEL DESENSAMBLE DE MxNCEs POR HClGnd

Desensamblar a los MxNCEs es una parte importante del desarrollo experimental ya que es necesario que el nanocompartimento pierda estructura dejando expuesto el interior de este para su libre interacción con la proteína cargamento. Por lo ya

descrito, se caracterizó el desensamble de NCEs de EncA a altas concentraciones de cloruro de guanidinio (HClGnd) con las siguientes metodologías descritas.

Dispersión dinámica de luz (DLS)

En condiciones al equilibrio se hicieron lecturas del diámetro de los nanocompartimentos con DLS en amortiguadores con altas concentraciones de agente desnaturante (HClGnd). La disminución del tamaño de la partícula es un indicador del desensamble del nanocompartimento en unidades más pequeñas como tetrámeros o subunidades formadoras del compartimento. Sin embargo, a altas concentraciones del agente desnaturante es de esperarse que el tamaño medido por DLS se incremente al desplegar por completo al monómero.

SEC

Se caracterizó el perfil de elución de los MxNCEs de EncA por cromatografía de exclusión molecular (SEC, por sus siglas en inglés), la técnica permite una separación de proteínas en tiempo o volumen de elución, relacionado a su peso molecular, a su vez, relacionado con tamaño, plegamiento, y linealidad, entre otros factores. Se utilizó una columna preempacada Superdex 200 16/600 pg compuesta por una resina entrecruzada de agarosa y dextran.

El protocolo para la elución fue el siguiente:

1. Se equilibró la columna con 1.5 volúmenes de la columna (180 mL) con solución amortiguadora en la que se encuentre la muestra (Amortiguador de fosfatos y 4 M HClGnd).
2. Se inyectó un volumen de 3 mL de la muestra a un flujo de 0.7 mL/min.
3. El flujo con el que se eluyó fue de 0.7 mL/min.
4. El tiempo en el que se comenzó a coleccionar las fracciones fue a partir de los 60 min.
5. Para el análisis de resultados se realizó una curva de calibración. Anexo 2.3.

Dicroísmo Circular en la región del UV lejano

Los espectropolarímetros (instrumentos que determinan el dicroísmo circular, CD) son utilizados para estudios estructurales en las condiciones en las que las proteínas realmente operan (es decir, generalmente en solución), así como en otras condiciones y para proporcionar medidas de las tasas de cambios estructurales de las proteínas, que a menudo son esenciales para su función biológica. El efecto del dicroísmo circular surge en un plano de luz polarizada con dos componentes de polarización de igual magnitud, cada uno en sentidos opuestos, uno en dirección a las manecillas del reloj y otro en dirección opuesta: generando dos componentes de polarización circular. El CD se refiere a la diferencia que hay en la absorción de estos dos componentes al pasar a través de la muestra; si esta absorbe o no absorbe la luz y la magnitud de absorción de cada uno de los componentes (Kelly et al., 2005).

Se realizó una caracterización de la estructura secundaria del nanocompartimento de EncA mediante DC en el espectro de UV lejano, mediante este espectro podemos determinar la pérdida de estructura secundaria durante la exposición del nanocompartimento de EncA a condiciones desnaturizantes como concentraciones elevadas de HClGnd (3 y 6 M), a altas temperaturas y al equilibrio. Los ensayos de DC se realizaron en un espectropolarímetro Chirascan (Applied Photophysics). En todos los casos se siguió la señal de DC en el espectro de 200 a 260 nm, midiendo cada nanómetro, con 0.4 mg/ mL de la proteína en amortiguador de fosfato de sodio 10 mM, pH 7.4 a 25 °C en una celda de cuarzo de 1 mm de paso de luz.

Para la curva de desnaturización a diferentes concentraciones de HClGnd, el monocromador del equipo se fijó en 222 nm y se obtuvo un valor promedio de 200 mediciones.

Anisotropía de fluorescencia

La anisotropía o polarización de la fluorescencia son expresiones para el mismo fenómeno, en el presente trabajo lo referiremos simplemente como anisotropía. La anisotropía es un fenómeno en el que una partícula al ser excitada con luz polarizada genera un espectro de emisión también polarizado. Esto se debe a que, en una solución homogénea, los fluoróforos de una muestra están aleatoriamente orientados, por lo que aquellos que en el momento de la excitación estén en eje con el vector eléctrico serán excitados preferencialmente. Las medidas de anisotropía revelan el desplazamiento angular promedio por el que pasa un fluoróforo entre el evento de excitación y su subsecuente emisión en forma de fotón. El desplazamiento angular depende de la tasa de rotación difusional de la partícula, la forma y tamaño de la molécula en rotación y de la viscosidad del solvente. Así, mientras menor sea la tasa de difusión rotacional, mayor será el valor de anisotropía (Lakowicz, 2006).

Se utilizó el espectrofluorómetro PC1 (ISS©) para las lecturas de anisotropía de los triptófanos, la longitud de onda que se utilizó para la excitación fue de 280 nm, para excitación de triptófanos, y las lecturas de emisión se realizaron a una longitud de 328 nm. Las rendijas de emisión y excitación utilizadas fueron de 2.0 mm. Las lecturas se realizaron a las muestras de EncA desnaturalizadas con HCIGnd en condiciones al equilibrio.

ENSAMBLE *IN VITRO* DE MxNCEs BAJO CONDICIONES FISICOQUÍMICAS DETERMINADAS

Una vez desensamblados los MxNCEs se deben establecer las condiciones y la metodología para el reensamble del nanocompartimento y así poder obtener nanocompartimentos con proteínas cargamento en su interior ensamblados de forma *in vitro*. Para el ensamble *in vitro* fue necesario partir de condiciones desnaturalizantes que desensamblen el nanocompartimento pero que no generen una cantidad importante de agregados. Por ello se procedió a establecer una

metodología de reensamble con base en la eliminación del agente desnaturalizante y agregando agente estabilizante. Se partió de una solución de MxNCEs de EncA (1 mg/mL) desensambladas en un medio de 4 M de HClGnd y renaturalizando por dilución del HClGnd con amortiguador de fosfatos y agente estabilizante (L-Arg 0.3 M).

1. Una solución de 6 M de HClGnd se diluyó hasta 4 M de HClGnd con la solución de EncA y amortiguador de fosfatos, dejando una concentración final de 1 mg/mL de EncA en 5 mL. Se dejó en agitación a 37 °C durante 2 h, hasta llegar al equilibrio.
2. La muestra se caracterizó por DLS y anisotropía de fluorescencia.
3. Se comenzó la dilución, agregando 200 µL cada 5 min del amortiguador de fosfatos con L-Arg 0.3M, con agitación a 37 °C.
4. Una vez alcanzada la primera dilución (3 M de HClGnd) a una concentración final de 0.75 mg/mL de EncA se dejó 30 min en agitación y se caracterizó por DLS y anisotropía de fluorescencia.
5. Se continuó agregando 200 µL del amortiguador de fosfatos con L-Arg 0.3M cada 5 min y se dejó 30 min una vez que se alcanzó la segunda concentración (2 M de HClGnd) con una concentración de 0.5 mg/mL de EncA.
6. Se caracterizó por DLS y anisotropía de fluorescencia.
7. Los pasos se repitieron hasta llegar a una concentración de 1 M de HClGnd y 0.25 mg/mL de EncA, se dejó en incubación toda la noche hasta llegar al equilibrio y favorecer la formación de los nanocompartimentos.
8. Se dializó la muestra contra el amortiguador de fosfatos con L-Arg 0.3 M para eliminar el resto de HClGnd.

CARACTERIZACIÓN DEL ENSAMBLE *IN VITRO* DE MxNCEs

Se caracterizó el tamaño y ensamble de la proteína EncA por DLS, TEM, AFM y midiendo la anisotropía de fluorescencia que presenta la muestra con las metodologías descritas anteriormente. El ensayo se realizó por duplicado y el

agente desnaturizante se diluyó con solución de amortiguador de fosfatos/L-Arg 0.3 M y con amortiguador de fosfatos sin L-Arg.

ENCAPSULAMIENTO *IN VITRO* DE SFGFP-CLP

Se ha observado que las proteínas cargamento nativas de los MxNCEs presentan un péptido señal del encapsulamiento (CLP). Con este ensayo se observó el encapsulamiento de una proteína heteróloga (sfGFP) dirigida por el CLP, bajo condiciones controladas *in vitro*.

Con las condiciones previamente establecidas y caracterizados los desensambles y reensambles de los MxNCEs, se utilizó un procedimiento similar para el encapsulamiento *in vitro* de la sfGFP-CLP. La relación molar EncA:sfGFP-CLP utilizada en este ensayo fue de 1:1, se realizó con 3 nM de EncA y 3 nM de sfGFP-CLP. Como control negativo del ensayo se realizó el ensamble *in vitro* con la proteína sfGFP sin el péptido de cargamento (CLP).

La metodología para el ensamble de los nanocompartimentos con la proteína cargamento fue la anteriormente descrita, con excepción del paso 5 donde entre cada volumen del agente estabilizador L-Arg, se agregó la proteína sfGFP-CLP en amortiguador de fosfatos con el agente estabilizador L-Arg 0.3 M.

Los MxNCEs se separaron de sfGFP-CLP libre mediante SEC y se caracterizó el tamaño los MxNCEs por DLS con la metodología descrita anteriormente, la morfología se caracterizó por AFM, y el encapsulamiento se caracterizó por SDS-PAGE. El ensayo se realizó por triplicado.

RENDIMIENTO DEL REENSAMBLE

Para cuantificar el rendimiento del reensamble se consideró la masa inicial de proteína en el desensamble como el 100% y la masa final de proteína en el proceso de reensamble como el porcentaje de NCEs ensamblados.

ENCAPSULAMIENTO *IN VIVO* DE SFGFP-CLP

El encapsulamiento de la proteína sfGFP-CLP se realizó *in vivo* mediante la coexpresión de las proteínas EncA y sfGFP-CLP en *E. coli* BL21 (DE3).

Para la obtención de células transformantes con ambos vectores de expresión (pET28a-sfgfp-clp y pET22b-encA) se hicieron células competentes a partir de células previamente transformadas con el plásmido pET22b-encA:

1. Se dejó en cultivo de células toda la noche un pre inculo de 10 mL de cultivo LB-amp a 37 °C, 220 r.p.m.
2. Al día siguiente se inoculó un matraz de 50 mL con medio LB-amp con el 1% del pre inculo, se dejó en agitación a 220 r.p.m a 37°C durante 4 h hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ alta (0.8-1).
3. Se colectó la biomasa por centrifugación a 5000 r.p.m. por 20 min a 4 °C. A partir de este paso todas las soluciones y la metodología se realizó a 4 °C y en baño de hielo.
4. Se resuspendió la biomasa obtenida a partir de 50 mL de medio de cultivo en 50 mL de agua destilada estéril para lavados. Se realizaron 2 lavados con agua.
5. Se recuperó la biomasa por centrifugación a 5000 r.p.m. por 20 min a 4 °C y se re suspendió en 1 mL de glicerol 10%.
6. Se dividieron las células en alícuotas de 50 µL y se mantuvieron a -70 °C para su posterior transformación.
7. La electroporación se realizó con una de las alícuotas de 50 µL de las células, 5 µL del plásmido resuspendido en 50 µL de agua destilada y con un pulso de 2.5 kV en una celda de 1 cm.

Para la caracterización del encapsulamiento *in vivo* de la sfGFP-CLP, los MxNCEs se purificaron por IMAC, y como segundo protocolo de purificación se separaron los MxNCEs con sfGFP-CLP en su interior y la sfGFP-CLP libre por SEC, y posteriormente se caracterizó la fracción de los MxNCEs por SDS-PAGE.

DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE REENSAMBLE Y ENCAPSULAMIENTO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LOS MxNCEs

Se realizó la cuantificación de la concentración de EncA reensamblada en NCEs y sfGFP encapsulada *in vitro* e *in vivo*. Con estos datos es posible hacer una comparación de la eficiencia del encapsulado de las proteínas cargamento y, con el control negativo de la proteína cargamento sfGFP sin CLP, proteína que se expresó y purificó con la metodología de sfGFP-CLP, se puede hacer una comparación de la eficiencia del encapsulado de moléculas por MxNCEs. La cuantificación de concentración se describe a detalle en seguida:

1. Se cuantificó, por el método de BCA previamente descrito, la concentración de proteína con los que se iniciaron los protocolos de desensamble de los MxNCEs, reensamble y encapsulado de sfGFP-CLP y sfGFP en los MxNCEs.
2. Al finalizar los protocolos de reensamble y encapsulado, los MxNCEs purificados por SEC se concentraron 10 veces y se cuantificó la concentración total de proteína por el método de BCA.
3. Para determinar la concentración de sfGFP-CLP y sfGFP presentes en los MxNCEs se realizó una curva patrón de concentración de sfGFP-CLP y sfGFP, en el fluorómetro.
4. Se realizó una curva patrón de sfGFP-CLP por SDS-PAGE y, por densitometría, se cuantificó la concentración de sfGFP-CLP presente en su encapsulamiento por los MxNCEs.
5. Se compararon ambas concentraciones (las obtenidas por densitometría y por fluorescencia).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

OBTENCIÓN DE CÉLULAS TRANSFORMANTES *E. coli* BL21(DE3)

Las células quimiocompetentes de *E. coli*, se transformaron por separado con dos plásmidos, pET22b-*encA* y pET28a-*sfGFP-clp*. La selección de colonias se realizó en placas Petri con Medio LB por medio de los antibióticos ampicilina y kanamicina respectivamente. Las colonias seleccionadas sobreexpresaron las proteínas de interés, como se mostrará en los resultados posteriores. Las células transformantes a una D.O.₆₀₀ de 0.6 se almacenaron a -70 °C con 50% de glicerol.

SOBREEXPRESIÓN DE EncA Y sfGFP-CLP EN *E. coli* BL21 (DE3)

Después de inducir la sobreexpresión de las proteínas recombinantes EncA y sfGFP-CLP en *E. coli* BL21(DE3) según la metodología, la biomasa lisada fue separada en fracciones soluble e insoluble, las cuales fueron analizadas por SDS-PAGE para saber en cuál fracción se encontraba la proteína (Fig. 9). La proteína sfGFP-CLP es más fácil de identificar debido a su color verde. En la figura 9 se observan las bandas de sobreexpresión de ambas proteínas y, aunque la banda se presenta en ambas fracciones, la mayor proporción se encuentra en la fracción soluble. Las bandas de sobreexpresión que corresponden a EncA y sfGFP-CLP presentan migraciones congruentes con sus tamaños teóricos (~32 y ~30 KDa, respectivamente) (Cassidy-Amstutz et al., 2016; Mchugh et al., 2014).

PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

La purificación de las proteínas EncA y sfGFP-CLP se realizó mediante IMAC en un equipo de FPLC, y las fracciones se analizaron por SDS-PAGE para evaluar la pureza de la proteína y cantidad por BSA (Anexo 3). Las proteínas puras se observan en la Fig. 9: sfGFP-CLP (~30 KDa), A carril 4, y EncA (~32 KDa), B carril 1.

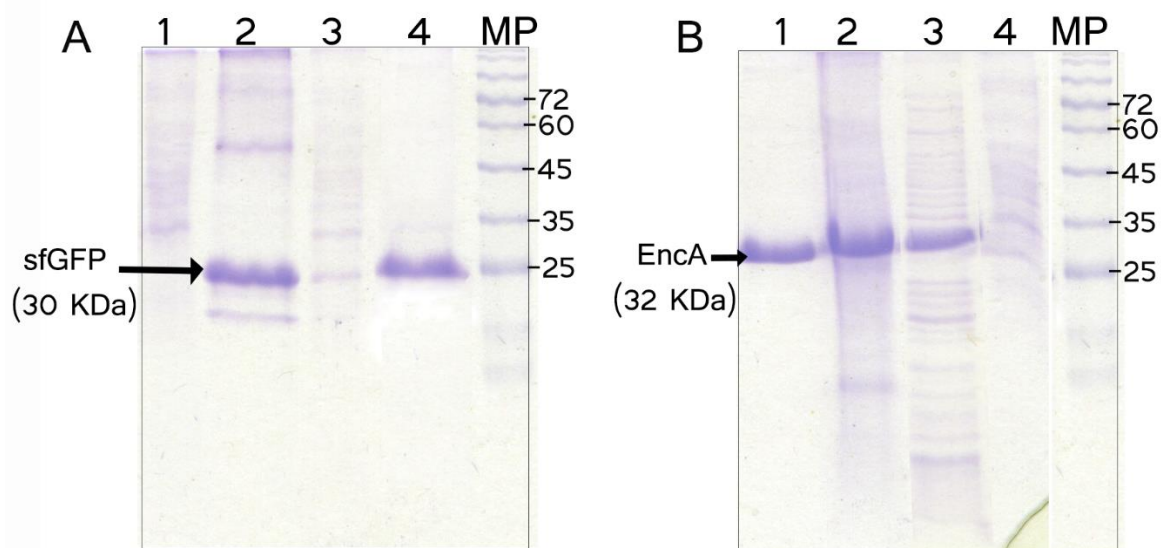


Figura 9. Análisis de sobreexpresión y purificación de las proteínas sfGFP-CLP y EncA mediante gel de poliacrilamida SDS-PAGE. A) Carril 1: control negativo de inducción de sfGFP-CLP. Carril 2: perfil de proteínas presente en la fracción soluble de la lisis de la biomasa inducida. Carril 3: perfil de proteínas presente en la fracción insoluble de la lisis de biomasa inducida. Carril 4: sfGFP-CLP purificada por IMAC. MP: marcador de peso molecular (KDa). B) Carril 1: EncA purificada por IMAC. Carril 2: EncA presente en la fracción insoluble de la lisis. Carril 3: EncA presente en la fracción soluble de la lisis. Carril 4: Control negativo de inducción de EncA. MP: Marcador de peso molecular (KDa).

DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN Y GRADO DE PUREZA DE EncA Y sfGFP-CLP

Partiendo de la purificación de las proteínas por IMAC, el análisis por SDS-PAGE (Anexo 3) de las fracciones de purificación y su cuantificación por el método del BCA, se obtuvieron 9 mg de proteína EncA a partir de un cultivo de 1 L y 2.4 mg de sfGFP-CLP a partir de un cultivo de 200 mL (12 mg por L de cultivo) (Tabla 2).

Tabla 2. Valores de la purificación de la proteína EncA y sfGFP-CLP.

<i>Muestra</i>	Volumen del cultivo (L)		Volumen total (mL)	Concentración (mg/mL)	Proteína total (mg)
<i>EncA</i>	1	Purificada	15 mL	0.65±0.001	9.1±1
<i>sfGFP-CLP</i>	0.2	Purificada	10 mL	0.24 *	2.4
<i>MxNCEs-sfGFP-CLP</i>	0.5	Purificada	4.5mL	3.75 *	16.87

* Expresión y purificación única

Con los valores de purificación y pureza de las proteínas fue posible obtener los resultados descritos a continuación.

CARACTERIZACIÓN DE MxNCEs PRODUCIDOS EN *E.coli* BL21(DE3)

Hipotéticamente, la proteína EncA purificada por IMAC podría estar formando MxNCEs. Para determinar el estado de asociación de EncA, ésta se analizó por DLS y TEM. El diámetro obtenido por DLS muestra una sola población de nanocompartimentos de $\sim 35 \pm 7$ nm (Fig. 10).

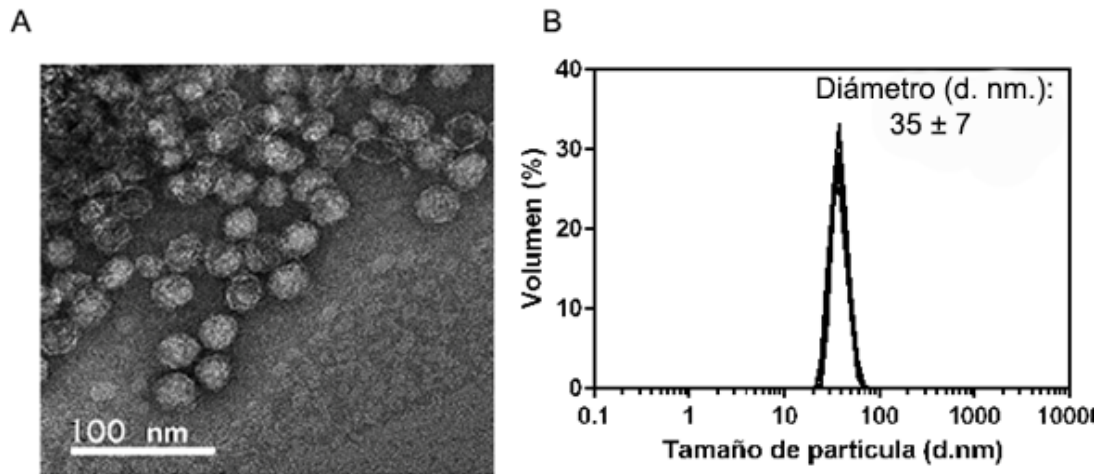


Figura 10. Caracterización de MxNCEs nativos con diferentes técnicas. (A) Microscopía por TEM de MxNCEs purificadas. (B) Diámetro por DLS de los MxNCEs purificados.

Los resultados de la sobreexpresión, purificación y caracterización indican que la proteína EncA se autoensambla *in vivo* en NCEs. Desde la lisis celular, la proteína se encuentra soluble, sugiriendo un plegamiento correcto y por ende la formación de los nanocompartimentos. El autoensamble de la proteína recombinante en *E. coli* ya se ha reportado previamente (Mchugh et al., 2014). En nuestro caso, la proteína EncA no es propiamente la versión silvestre, sino que tiene una etiqueta de 6xHis. Su purificación por IMAC en condiciones nativas indica que esta etiqueta está en la superficie externa de los MxNCEs, como lo sugiere la estructura de estas partículas (PDB 4PT2). La caracterización llevada a cabo demuestra que los MxNCEs formados con la proteína EncA con etiqueta de 6xHis forman poblaciones homogéneas y de tamaños similares a los descritos en la literatura (Mchugh et al., 2014; Nichols, Cassidy-Amstutz, et al., 2017; Sasaki et al., 2017).

DETERMINACIÓN DE CONDICIONES FISICOQUÍMICAS PARA EL DESENSAMBLE DE MxNCEs

Para establecer las condiciones para el desensamble de los MxNCEs, se caracterizó el tamaño de éstos bajo diferentes condiciones desnaturizantes: tales

como el cambio de pH por diálisis, modificando la temperatura, o sometidos a altas concentraciones de agentes caotrópicos como cloruro de guanidinio (HClGnd) o Urea (U). La aparición de especies con diámetros menores al característico de los MxNCEs (~35 nm) son un buen indicador del desensamble de los nanocompartimentos (Putri et al., 2017; Snijder et al., 2016). Las condiciones desnaturizantes generaron varias especies, las mayoritarias se muestran en la Fig. 11, mientras que en la Tabla 3 se presentan los valores del índice de polidispersión (PId) de la muestra y la presencia de especies mayores a las graficadas en la Fig. 11. El PId es una medida de la distribución de tamaños presentes en la muestra. En diferentes concentraciones de HClGnd, los MxNCEs, analizados por DLS, reducen significativamente su tamaño desde 2 M de HClGnd (Fig 11, A), sugiriendo la pérdida de la estructura del nanocompartimento.

Por su parte, el cambio de pH del medio en que se encuentran los MxNCEs provoca la aparición de partículas de tamaños distintos a los observados a pH 7.4. A valores de pH menores a 7, las partículas presentan tamaños de entre 20 y 50 nm, sin agregación evidente de acuerdo con el valor de Z-average (Tabla 3). El Z-average es el promedio de tamaño de todas las intensidades detectadas, no solo de la o las poblaciones mayoritarias. A valores de pH mayores a 8, se pierde la estabilidad coloidal y es evidente la aparición de agregados (Fig. 11, B). A diferencia de lo reportado por Cassidy-Amstutz y colaboradores en el 2016 y por Putri y colaboradores en el 2017, para el desensamble de nanocompartimentos de otras especies, los MxNCEs no regresan a su estado de partículas monodispersas y solubles al regresar el pH a 7.4, siendo irreversible en éstos el efecto de agregación en valores de pH básicos, mientras que en valores bajos de pH el desensamble es irreversible por efecto de agregación al retornar el medio a pH 7.4.

La temperatura tuvo efectos inesperados sobre el tamaño de los MxNCEs. Se observó que a bajas temperaturas las nanopartículas agregan (4 °C), recuperan su tamaño promedio de 35 nm en la transición de 25 a 35 °C y comienzan a disminuir el tamaño a 40 °C, mientras que a 60°C recuperan su tamaño, aunque aparecen especies de mayor tamaño que posiblemente sean agregados (Fig. 11, C). La

formación de agregados es evidente en las medidas del Z-average (Tabla 3).

Finalmente, se observó que aún a concentraciones de 2 y 5 M de U, los MxNCEs presentan mayoritariamente tamaños estables de 26 nm, y parece comenzar una disminución del tamaño de las partículas en soluciones de 6 M de U (Fig. 11, D). La presencia mayoritaria de nanopartículas de 26 nm de diámetro sugiere que se trata de capsómeros abiertos o ensamblajes desiguales de los NCEs. Esta desigualdad se refleja en el alto valor de Z-average que presenta la muestra en 5 M de U, mientras que el Z-average de la muestra en 2 M se encuentra relativamente cercano al control. Es posible que estas especies sean MxNCEs de menor tamaño, ya que proteínas con plegamientos similares pueden formar NCEs T=1, como la de *T. maritima* con tamaño promedio de 24 nm (Sutter et al., 2008).

Tabla 3. Resultados del cambio de diámetro de los NCEs por DLS en diferentes condiciones desnaturalizantes.

Agente caotrópico	Nivel	Tamaño de partícula (d.nm)	Z-average (nm)	Índice de polidispersión (PId)
HClGnd (M)	Ctrl (0)	38 ± 5	46 ± 0.5	0.31 ± 0.01
	2	12 ± 2	92 ± 7.0	0.54 ± 0.05
	4	15 ± 2	61 ± 3.0	0.64 ± 0.13
	5	10 ± 1	60 ± 4.0	0.35 ± 0.08
	6	10 ± 1	72 ± 2.0	0.37 ± 0.07
pH	Ctrl (7.4)	38 ± 4	46 ± 0.1	0.16 ± 0.20
	3	21 ± 3	29 ± 0.7	0.31 ± 0.32
	4	24 ± 3	27 ± 1.0	0.23 ± 0.32
	6	38 ± 5	47 ± 0.5	0.16 ± 0.20
	8	412 ± 17	151 ± 14.7	0.55 ± 1.00
Temp (°C)	Ctrl (37)	35 ± 2	42 ± 1.0	0.2 ± 0.04
	4	59 ± 8	433 ± 30.0	0.46 ± 0.03
	25	24 ± 3	83 ± 16.0	0.57 ± 0.07
	30	38 ± 5	73 ± 1.0	0.37 ± 0.03
	40	21 ± 3	2085 ± 2870.0	0.57 ± 0.08
	60	38 ± 5	105 ± 35.0	0.57 ± 0.08
Urea (M)	Ctrl (0)	34 ± 5	45 ± 2.0	0.19 ± 0.01
	2	24 ± 1	41 ± 2.0	0.48 ± 0.06
	5	25 ± 1	162 ± 30.0	0.37 ± 0.09
	6	23 ± 1	132 ± 13.0	0.56 ± 0.09

*Cloruro de guanidino (HClGnd), Control (Ctrl), diámetro en nanómetros (d.nm). Cada ensayo se realizó de forma independiente.

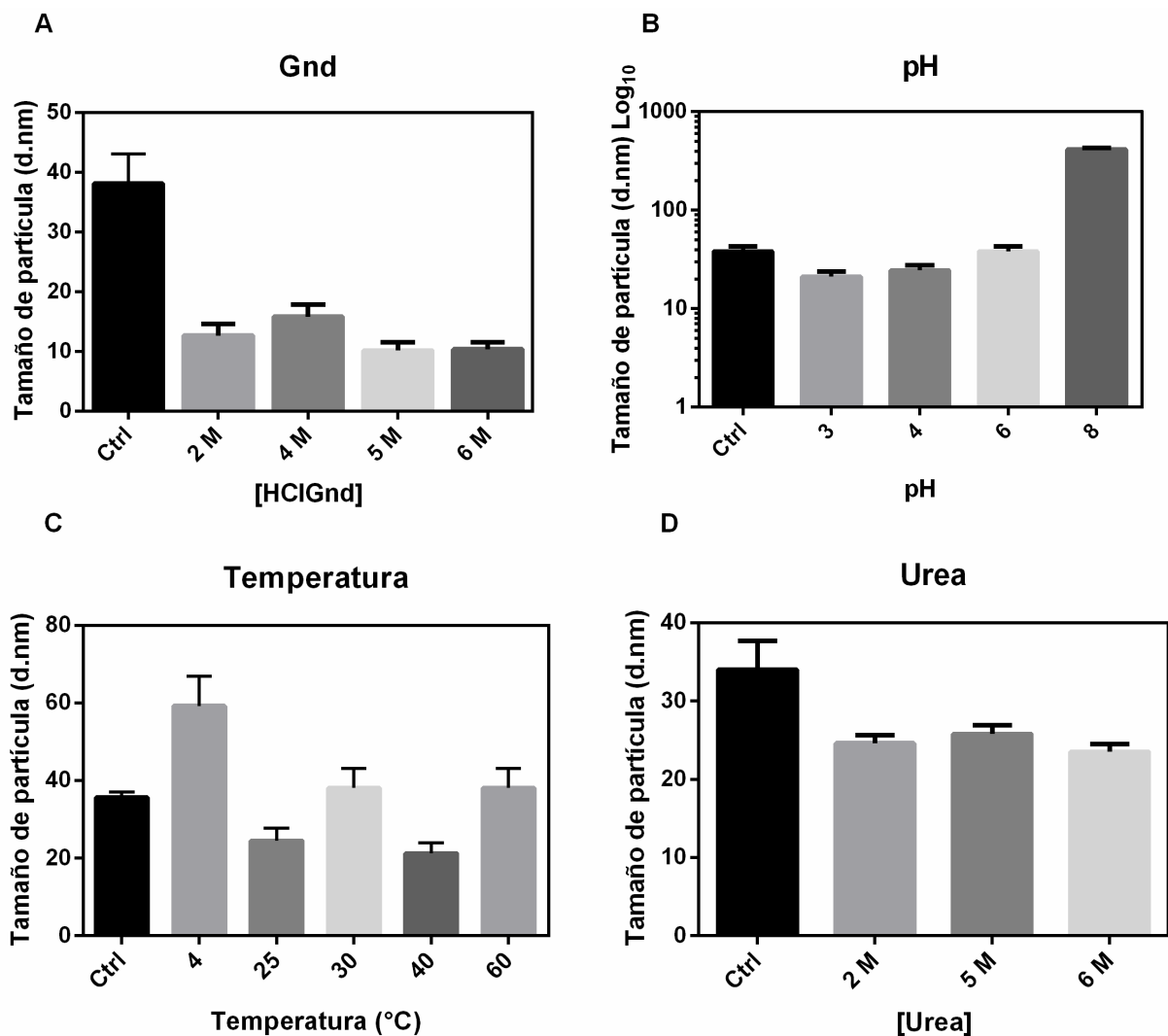


Figura 11. Tamaños de las poblaciones de MxNCEs bajo diferentes condiciones desnaturizantes, obtenidos por DLS. A) diámetro de los MxNCEs por DLS después de haber sido sometidas a determinada concentración de Cloruro de guanidinio (HClGnd). B) Diámetro de las partículas de MxNCEs por DLS después de haber sido sometidas a diferentes valores de pH. C) Diámetro de las partículas de MxNCEs por DLS después de haber sido sometidas a diferentes temperaturas durante 30 min en agitación a 300 r.p.m. D) Diámetro de los MxNCEs por DLS después de haber sido sometidas a distintas concentraciones de urea (U).

La proteína EncA autoensamblada en MxNCEs *in vivo* y, caracterizada por DLS, presenta una población monodispersa (Fig. 10B). Estos tamaños son considerados controles de MxNCEs ensamblados similares a los reportados por McHugh y colaboradores en el 2014 y Sigmund y colaboradores en el 2017. Para poder encapsular proteínas heterólogas *in vitro* en estos nanocompartimentos, es

necesario desensamblarlos. En muchos casos, las condiciones desnaturalizantes probadas generaron poblaciones polidispersas, así que para determinar las condiciones de desensamble funcionales, se usó como criterio principal su capacidad de reensamblarse. Esto a su vez está asociado a una buena solubilidad, tamaño de partícula no muy grande y monodispersidad por DLS.

Después de realizar los ensayos de desensamble, se seleccionó como condición de desensamble funcional a la proteína EncA en 4 M de HClGnd, ya que el tamaño de las partículas disminuye significativamente respecto al control e incluso es mucho menor que el de una hipotética partícula T=1 (~24 nm). Asumimos que una disminución en el tamaño de éstas es reflejo de la pérdida de estructura del nanocompartimento, sin un desplegamiento total de los monómeros (Cassidy-Amstutz et al., 2016; Putri et al., 2017; Snijder et al., 2016). Existen otras condiciones en las que la partícula también disminuye su tamaño, por ejemplo, a pH 3, a 40 °C, o en 6 M de Urea. Sin embargo, estos ambientes desnaturalizantes son muy extremos para poder trabajar en conjunto a los MxNCEs desensamblados y a una proteína heteróloga que se desee encapsular. Además, las poblaciones en estas muestras son polidispersas y, lo más importante, el desensamble de los MxNCEs no es reversible en esas condiciones. También se exploraron las combinaciones de escenarios desnaturalizantes, como pH bajo a bajas temperaturas, o concentraciones de urea bajas a altas temperaturas. Sin embargo, no se detectaron condiciones eficaces para el reensamble (datos no mostrados). Por ello, al analizar los datos de DLS, se eligió la condición de desensamble 4 M de HClGnd, 37°C y pH de 7.4, ya que la población de EncA presenta una disminución de tamaño y un bajo índice de polidispersión.

CARACTERIZACIÓN DEL DESENSAMBLE DE MxNCEs

Los efectos del agente desnaturizante sobre la estructura del MxNCE se evaluaron por DLS, anisotropía de los Trp propios de EncA, SEC y DC en el UV lejano, ya que dichas técnicas nos permiten estimar cambios estructurales y de asociación de las proteínas (Cassidy-Amstutz et al., 2016; He et al., 2016; Putri et al., 2017; Rahmanpour & Bugg, 2013). En la Fig. 12A se observa que la adición progresiva de HCIGdn produce la aparición de especies de menor diámetro. Estas especies podrían ser oligómeros y, en última instancia, hasta el monómero de EncA en un estado parcialmente plegado, considerando que una proteína globular de 30 kDa debería tener un diámetro hidrodinámico cercano a 6 nm (Putri, Allende-ballester, et al., 2017; Wilkins et al., 1999). Por otra parte, la disminución de la anisotropía revela, nuevamente, que el tamaño de la especie original (MxNCE) se reduce en presencia del agente caotrópico (Fig. 12B). Ambos resultados, el de DLS y el de anisotropía de fluorescencia, son consistentes con lo observado por SEC, en el que la presencia de 4 M de HCIGdn provoca que los MxNCEs eluyan en un volumen mucho mayor (76 mL) al volumen muerto de la columna (45 mL).

Los cambios en el espectro de DC en la región del UV-lejano nos ofrecen información acerca de la pérdida de estructura secundaria del monómero, la cual está asociada a los cambios en el estado de asociación del mismo. En condiciones nativas (0 M de HCIGnd, pH 7.4 y amortiguador de fosfatos), el espectro muestra señales características de las estructuras hélice α y hebras β propias del monómero de EncA (Fig. 5, PDB 4PT2), con un 17.3% de la contribución de hélices α , esto es, señales negativas entre los 210-222 nm, pero con el mínimo no solo a los 222 nm por las contribuciones de las hebras β con un porcentaje de 8.6%, el 74% restante de estructuras no se definen en el espectro debido a que se requieren espectros más limpios a longitudes de ondas bajas para definir mejor la estructura secundaria (Cassidy-Amstutz et al., 2016; Kelly et al., 2005) (Fig. 13).

Cuando EncA es sometida a altas concentraciones de HCIGnd, pierde estructuras helicoidales observadas a través de la desaparición parcial de la señal a 222 nm

(Fig.14). Cabe destacar que, abajo de 210 nm, la lectura de CD a esa concentración de agente desnaturante es sumamente ruidosa, por lo que no se continuó hacia longitudes de onda menores (Fig.13).

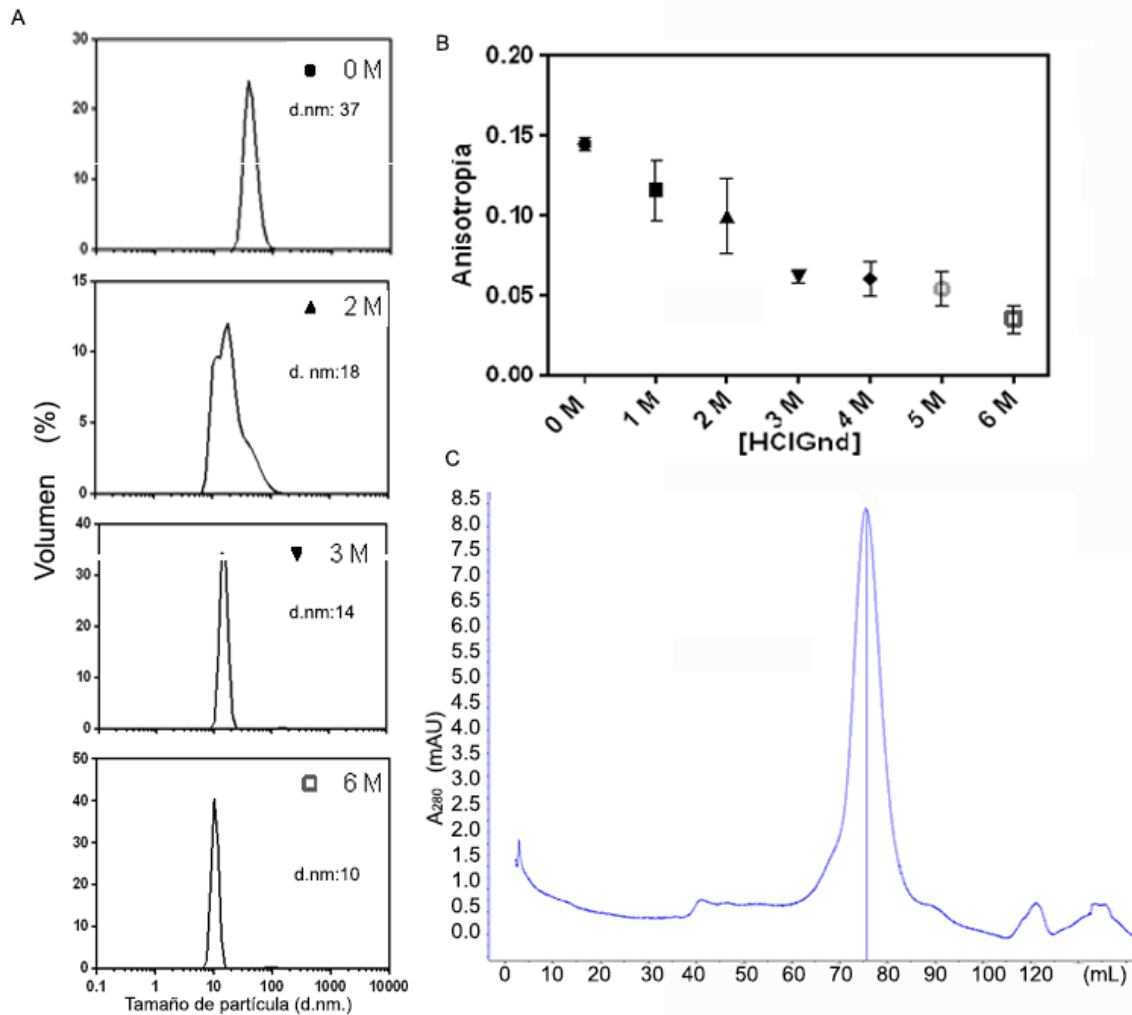


Figura 12. Análisis de los MxNCEs a diferentes concentraciones desnaturantes por DLS y anisotropía. A) Diámetros por DLS a las concentraciones de HClGnd indicadas, en la figura. B) Anisotropía de fluorescencia a diferentes concentraciones de HClGnd. C) Perfil cromatográfico (SEC) de la proteína EncA al equilibrio en 4 M de HClGnd. El volumen muerto de la columna (Superdex 200 pg) es de 45 mL.

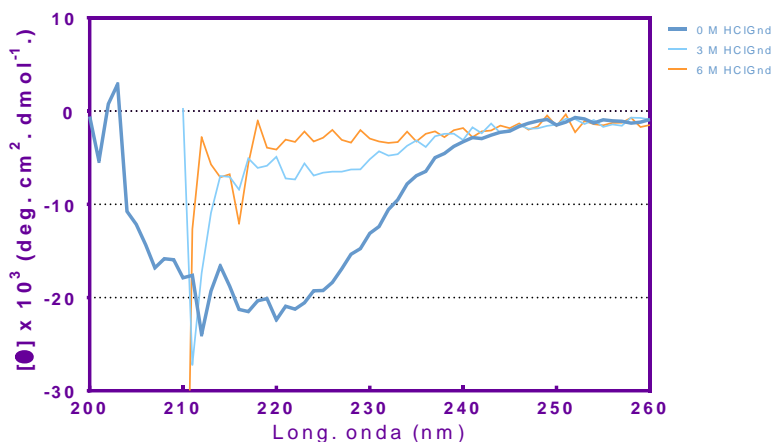


Figura 13. Espectros de DC de EncA al equilibrio en diferentes concentraciones de HClGnd. Las concentraciones de HClGnd evaluadas fueron 0 (azul), 3 (azul claro), y 6 M (naranja).

Una vez determinado el efecto del agente desnaturante sobre el espectro de DC, se realizó una curva de titulación siguiendo el DC de EncA a una longitud de onda de 222 nm. Se observó que a mayor concentración de HClGnd, la señal negativa a 222 nm disminuyó su magnitud, probablemente por la disminución del contenido de hélices α en la proteína (Fig. 14).

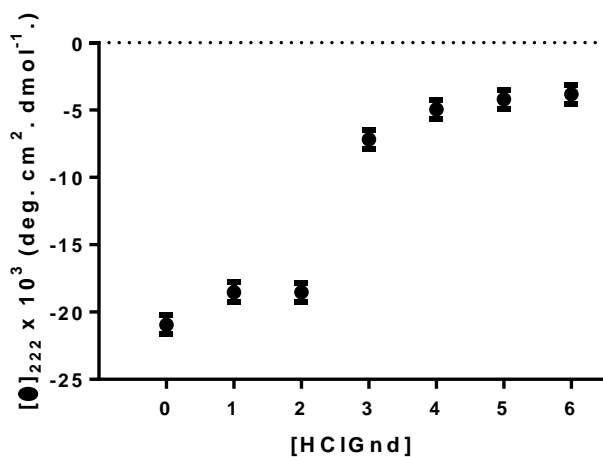


Figura 14. Dicroísmo Circular a 222 nm de EncA muestreado a diferentes concentraciones de HClGnd.

Existe una relación entre la anisotropía de los Trp de EncA, el tamaño de partícula y la pérdida de estructura secundaria de EncA (Fig. 15). A menor tamaño de partícula, menor anisotropía (Fig. 12 B) y menor contenido de hélices α en la estructura secundaria (Figs. 14 y 15), cabe resaltar que la disminución del tamaño de partícula en condiciones 2 M de HClGnd por DLS no es indicativo de un

desensamblado completo del nanocompartimento pues con otras técnicas como anisotropía y dicroísmo aún se observó estructura secundaria y la interacción de monómeros a ésta concentración de HCIGnd (Fig. 15). La anisotropía está relacionada con la interacción entre las subunidades de EncA que forman el MxNCE, y conforme estas interacciones disminuyen, debido a las condiciones desnaturizantes, la anisotropía de igual forma baja. Esto está relacionado con la libertad de movimiento rotatorio de los Trp en EncA en los nanocompartimentos ensamblados o desensamblados (Lakowicz, 2006; Misra, 2015).

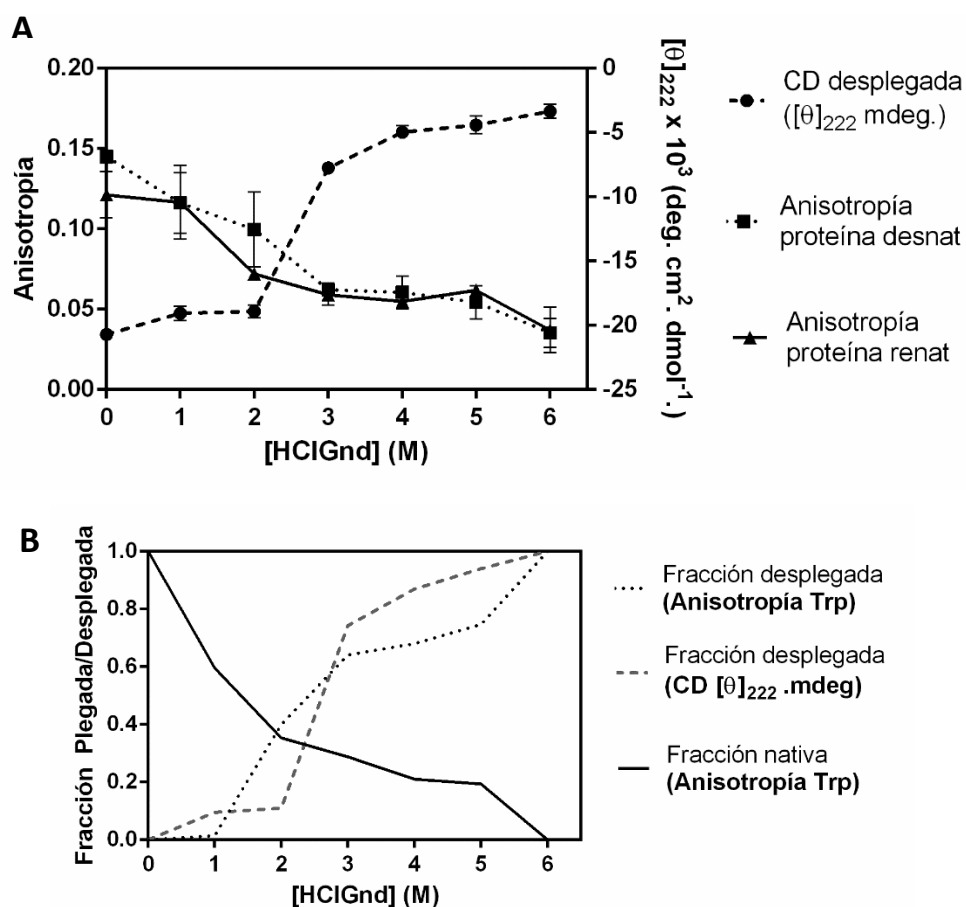


Figura 15. Gráfica de la transición del estado plegado y desplegado de EncA a diferentes concentraciones de HCIGnd. A) Comparación de las lecturas de anisotropía y CD a 222 nm al desplegar a EncA en altas concentraciones de HCIGnd (proteína desnat) y al renaturalizar a EncA regresándola a bajas concentraciones de HCIGnd (proteína renat). B) Gráfica de las fracciones plegada y desplegada de las proteínas en una concentración determinada de HCIGnd.

Con las técnicas de caracterización hidrodinámica es complicado saber con precisión el estado oligomérico de EncA o su estado conformacional. Una disminución de la estructura helicoidal en condiciones desnaturizantes nos indicó pérdida estructural del monómero, formado mayoritariamente por hélices α (Fig.5). Sin embargo, muchas interacciones entre monómeros son generadas por el E-loop y el P-domain del capsómero (Akita et al., 2007). La caracterización por DLS de EncA en condiciones desnaturizantes muestra diámetros comparables a otras encapsulinas desensambladas (Cassidy-Amstutz et al., 2016; He et al., 2016; Li et al., 2018; Putri et al., 2017; Rahmanpour & Bugg, 2013; Snijder et al., 2016). Encapsulinas con el mismo tipo de plegamiento (HK97), con 43% de similitud de secuencia con EncA, en diferentes condiciones desnaturizantes, presentan diámetros menores a 11 nm por DLS y, analizados por espectroscopia de masas, corresponden a subunidades formadoras del NCE (Sonotaki et al., 2017). He y colaboradores en el 2016 reportaron perfiles de elución de ferritinas de *R. rubrum* pertenecientes a 10 subunidades de la ferritina, comparables al volumen obtenido de EncA en condiciones de 4 M HClGnd (Fig. 12 C) que corresponde a 4 subunidades de EncA, según lo reportado (He et al., 2016) y la calibración de la columna S200 pg (Anexo 2.3). Por lo anterior, podemos asumir que a una concentración de 4 M de HClGnd se pueden desensamblar los MxNCEs. Esto confirma que este estado podría usarse como punto de partida para el reensamble de los MxNCEs y la concomitante encapsulación de proteínas modelo.

CARACTERIZACIÓN DEL ENSAMBLE *IN VITRO* DE MxNCEs BAJO CONDICIONES FÍSICOQUÍMICAS CONTROLADAS

EncA se autoensambla en MxNCEs *in vitro*. La caracterización de los MxNCEs por diferentes técnicas en condiciones desnaturizantes y regresarlos a condiciones nativas, en ambientes controlados y en presencia de un agente estabilizante (0.3 M de L-Arg), nos muestra que su comportamiento de reensamble seguido por anisotropía es comparable al del desensamble (Fig. 15), sugiriendo estados

reversibles en el desensamble y desnaturalización de la proteína EncA (Fig. 15 B). El mecanismo de ensamble para EncA de *M.xanthus* aún no se ha descrito, pero podemos especular, con los resultados obtenidos hasta el momento de la caracterización de la desnaturalización (Fig. 12) y el reensamble, que existen oligómeros de subunidades que, al retirar el agente desnaturalizante, interactúan para formar el nanocompartimento, siguiendo una vía de ensamble de dos estados, similar a la descrita para encapsulina de *T. marítima* (Snijder et al., 2016) (Fig. 16C).

La población de partículas reensambladas tiene un diámetro de 37 ± 8 nm con un Z-average de 63 ± 155 nm (Fig. 16A), diámetro ligeramente mayor al que presentan la población de partículas nativas (~ 36 nm), esto se debe a la presencia de agregados y la formación de nanocompartimentos de mayor tamaño (Fig. 16D y E). El análisis por anisotropía de las especies al equilibrio muestra que al disminuir la concentración del agente caotrópico también aumenta la anisotropía, por lo que las proteínas se están asociando en especies de mayor tamaño (Fig. 16B). Por último, al comparar la morfología de nanocompartimentos nativos con los reensamblados distinguimos tamaños similares a los nativos (33 ± 4 nm) sin embargo, las partículas reensambladas no son tan esféricas como las ensambladas *in vivo*, y se observa la presencia de especies de tamaños mayores y menores a estas últimas (Fig. 17).

Sabiendo que los MxNCEs se desensamblan y son capaces de reensamblarse en especies similares a las iniciales, nos enfocamos en utilizar las condiciones que favorecen la disociación de estos MxNCEs como punto de partida para encapsular a una proteína heteróloga que tuviera el péptido señal de carga (CPL) (Fig. 18), similar a lo reportado previamente (Cassidy-Amstutz et al., 2016; He et al., 2016; Putri et al., 2017; Rahmanpour y Bugg, 2013).

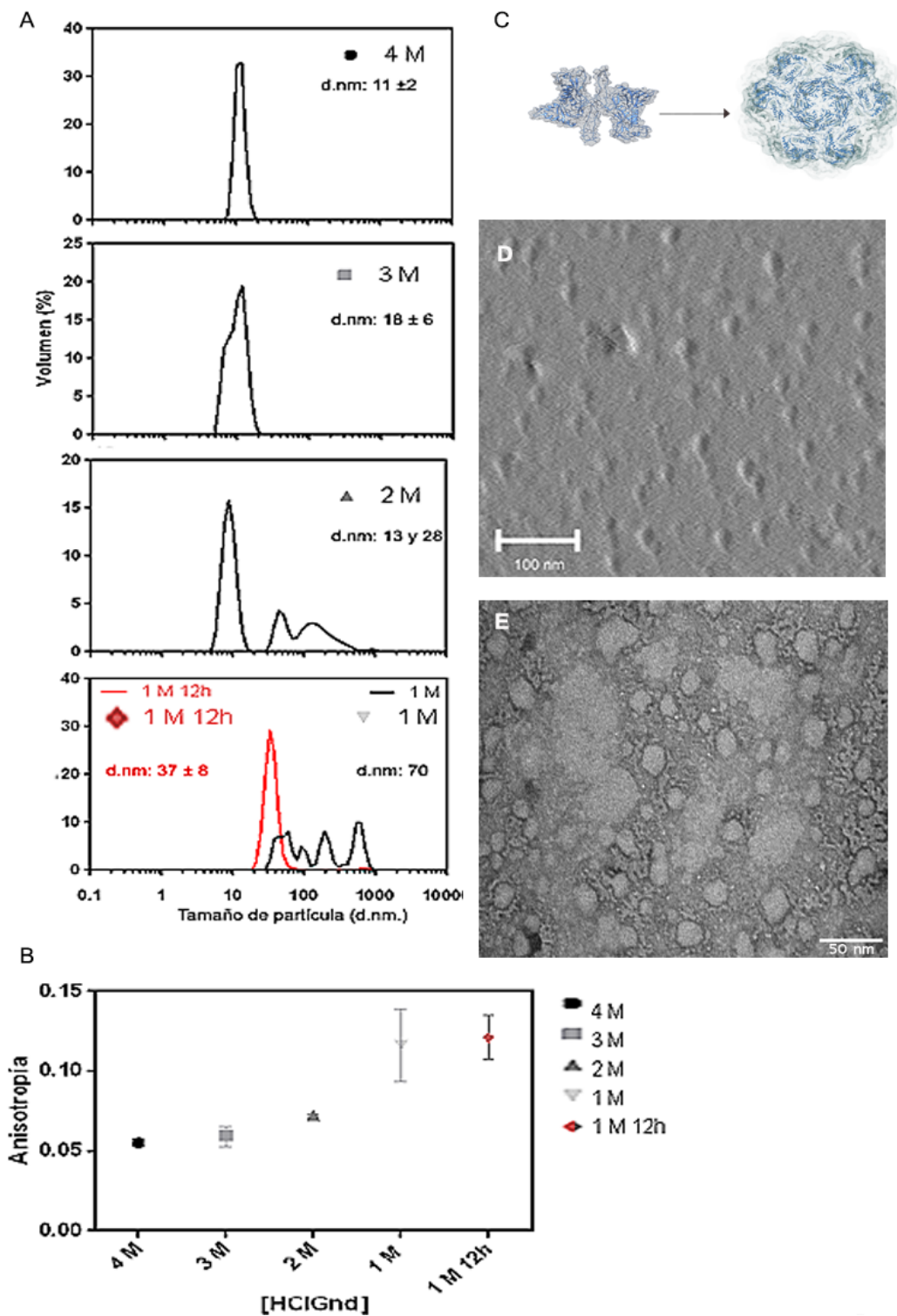


Figura 16. Caracterización del reensamble de nanocompartimentos de encapsulinas por diferentes técnicas. A) Diámetros por DLS a las concentraciones de HCIGnd indicadas. B) Anisotropía de fluorescencia correspondiente a las muestras analizadas por DLS. C) Esquema representativo de lo que podría estar sucediendo en el reensamble de los NCEs. D) Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) donde se observan partículas con tamaños de ~34 nm. Imagen adquirida en modo de contacto "tapping amplitude". E) Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM) donde se observan partículas de ~31 nm en promedio con una morfología semiesférica.

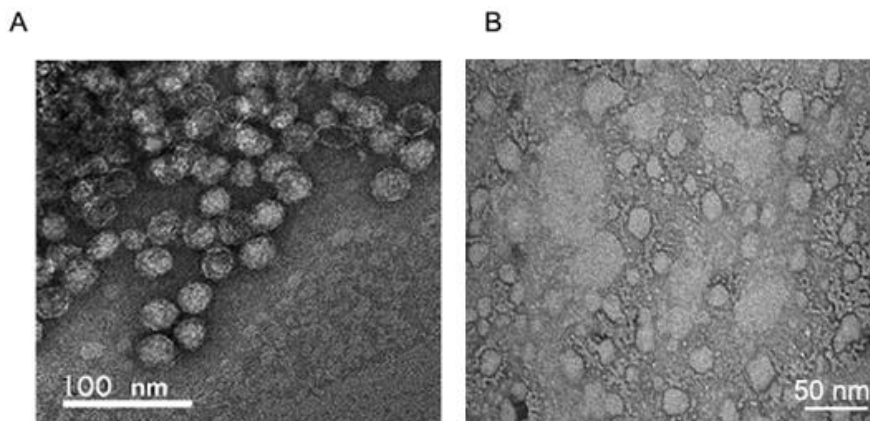


Figura 17. Comparación de MxNCEs ensamblados *in vivo* y reensamblados *in vitro*. A) Microscopía por TEM de MxNCEs *in vivo* donde se observan partículas semiesféricas de 33 ± 4 nm B) Microscopía por TEM donde se observan MxNCEs reensamblados de 31 ± 6 nm en promedio con una morfología semiesférica y agregados.

ENCAPSULAMIENTO *IN VITRO* DE sfGFP-CLP

El encapsulamiento *in vitro* de la sfGFP-CLP en los MxNCEs (MxNCEs+ sfGFP-CLP) se llevó a cabo según la metodología descrita previamente. La proteína sfGFP-CLP libre (sin encapsular) se separó de los MxNCEs con la sfGFP-CLP en su interior mediante SEC, una vez separado el nanocompartimento de la proteína libre se procedió a caracterizar por diferentes métodos. En la Fig. 18 se observa la caracterización de dicho encapsulamiento, como control negativo de encapsulamiento de la sfGFP-CLP se utilizó una sfGFP sin el péptido de carga, expresada y purificada igual que la sfGFP-CLP.

Los tamaños de la población de MxNCEs reensamblados en presencia de sfGFP-CLP durante el reensamble, analizados por DLS, muestran un ligero incremento en su tamaño (43 ± 13 nm) con una desviación estándar que contempla el tamaño de partículas nativas. Este aumento de tamaño de las partículas podría deberse a la formación de agregados presentes en la población (Z-average 52 ± 8) (Fig. 18B y F (recuadro)). Debido a que el tamaño de partícula sólo nos brinda información del ensamble del nanocompartimento, pero no de lo que hay en su interior, se realizó una caracterización con geles SDS-PAGE (Fig. 18C) y espectroscopía de fluorescencia (Fig. 21A) a los nanocompartimentos ensamblados separados por

SEC de la sfGFP-CLP libre (Fig. 18D). El reensamble en presencia de sfGFP sin el CLP (sfGFP-L) como control negativo se analizó de igual forma por SDS-PAGE y espectroscopía de fluorescencia los MxNCE separados por SEC de la sfGFP libre (Figs.18C y 21A).

La purificación de los MxNCEs+sfGFP-CLP reensamblados de la sfGFP-CLP libre por SEC en la columna Superdex 200 pg genera dos fracciones principales; los MxNCEs +sfGFP-CLP (~50 mL, volumen mayor al volumen muerto), con una aparente retención por la columna debido a efectos cromatográficos de intercambio iónico, donde es posible que la resina se encuentre interaccionando con la proteína por falta de fuerza iónica de la fase móvil, recorriendo el tiempo de retención de la proteína por la columna, otro factor que puede contribuir el desplazamiento del tiempo de retención en el cromatograma a tiempos mayores de elución es el volumen de inyección (5 mL en el presente trabajo) donde a menor volumen de inyección la resolución mejora significativamente. La segunda fracción es la sfGFP libre en el medio (90 mL) (Fig. 18D).

La caracterización de morfología por TEM y AFM (Fig. 18, E y F) podemos observar la población de partículas reensambladas de las MxNCEs de EncA con sfGFP-CLP en su interior, esferas de 39 ± 11 nm, tamaños similares a los establecidos en los reensambles sin sfGFP-CLP (~31 nm). Predomina en la población de partículas una morfología esférica y las que no se observan de este modo puede que estén saturadas con proteína cargamento y no permitió la completa formación de los MxNCEs. También se observa una reducción en los agregados en comparación con los reensambles sin sfGFP-CLP.

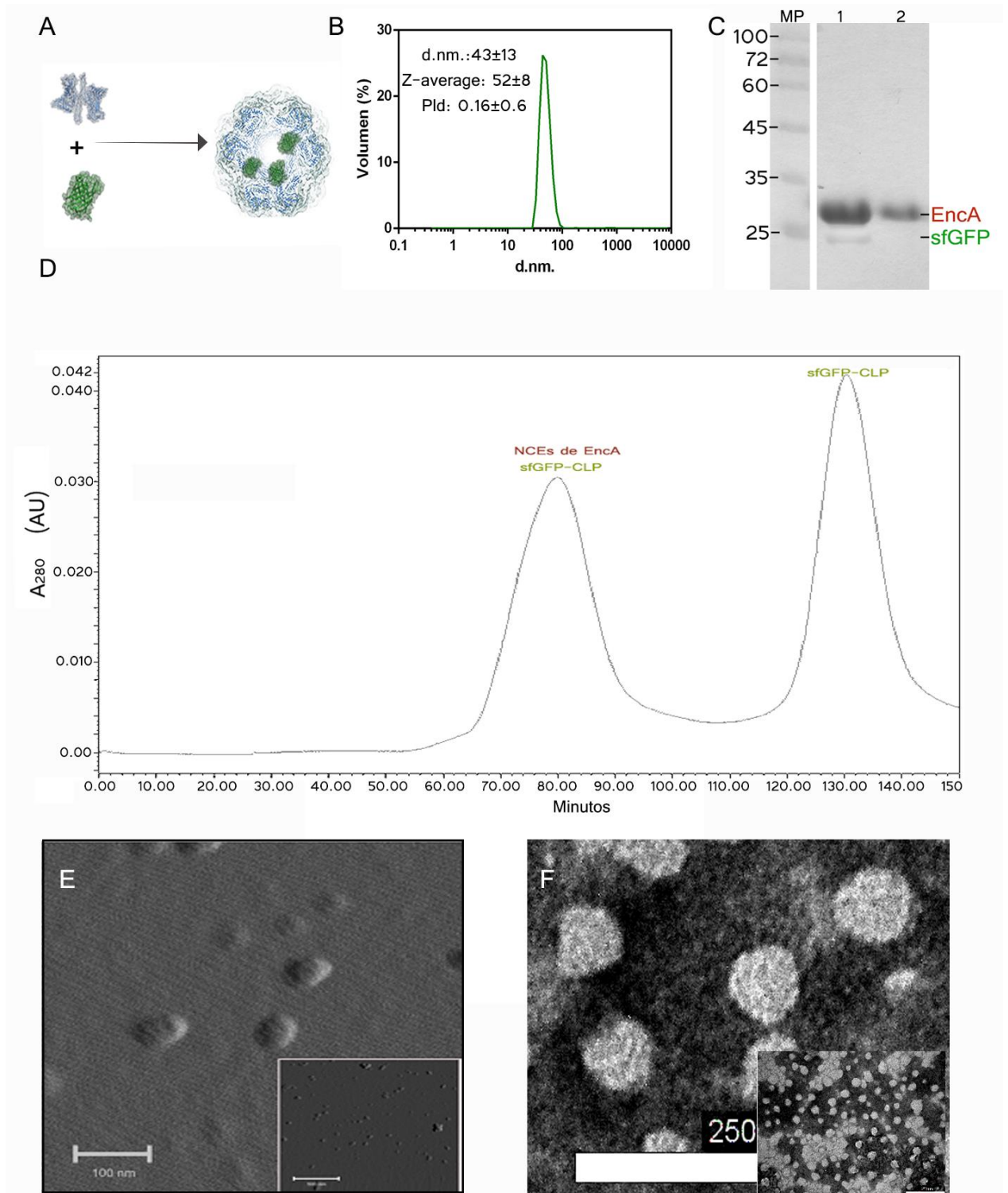


Figura 18. Caracterización del reensamble de MxNCEs con sfGFP-CLP por diferentes técnicas. A) Esquema representativo de lo que podría estar sucediendo en el reensamble del nanocompartimento. B) Diámetros por DLS de los reensambles de MxNCEs con sfGFP-CLP. C) Gel SDS-PAGE de los MxNCEs con sfGFP-CLP en su interior, MP: marcador de peso molecular

(KDa), 1: EncA+sfGFP-CLP, 2: EncA+sfGFP. D) Cromatograma de elución de los NCEs de EncA reensamblados, tiempo de elución (min) en la columna Superdex 200 pg a 0.7 mL/min en amortiguador de fosfatos y Arg 0.3M. E) Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) donde se observan partículas con tamaños de ~39 nm. Inserción, microscopía con menor aumento, barra de escala es de 500 nm. Imagen adquirida en modo de contacto "tapping amplitude". F) Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM) donde se observan partículas de ~37 nm en promedio con una morfología esférica. Inserción microscopía con menor aumento del campo, barra de escala es de 250 nm.

La proteína sfGFP con el péptido señal de cargamento (sfGFP-CLP) es encapsulada *in vitro* por los MxNCEs. El péptido CLP facilita el encapsulamiento de la proteína dentro la partícula, esto lo podemos comprobar de forma visual en el gel SDS-PAGE de las Figs. 18 C y 20, donde el encapsulamiento en presencia de la sfGFP fue indetectable. Cabe destacar que el reensamble de los nanocompartimentos no se afectó por la presencia de sfGFP-CLP en el medio, pues la morfología que se observa en las microscopias es similar a la observada en los MxNCEs silvestres (Cassidy-Amstutz et al., 2016; Lon et al., 2020; McHugh et al., 2014; Rahmanpour & Bugg, 2013).

CO-EXPRESIÓN DE EncA y sfGFP-CLP *IN VIVO*

El ensamble y encapsulamiento *in vivo* de los NCE con moléculas heterólogas al interior se ha explorado para la capsulina de *T. maritima* (Tabla 2, Anexo 1). Con el objetivo de realizar el encapsulamiento *in vivo* de sfGFP-CLP dentro de los MxNCEs, se coexpresaron las proteínas EncA y sfGFP-CLP en *E. coli* BL21(DE3). En la fracción soluble de la lisis se observaron ambas proteínas sobreexpresadas, de modo que su purificación previa por IMAC fue sencilla (Fig. 19) para que posteriormente se realizara la separación de los MxNCEs de la sfGFP-CLP libre por SEC.

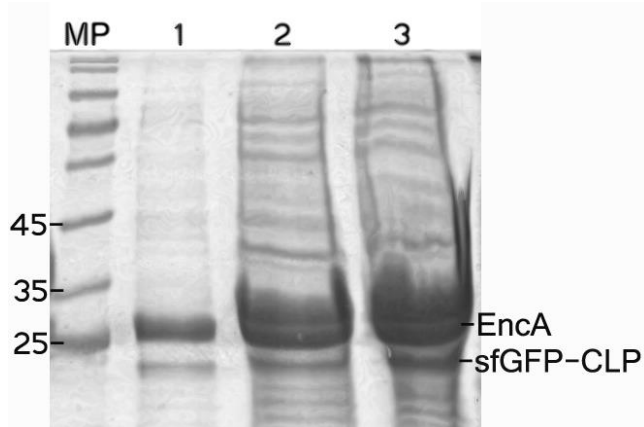


Figura 19. Gel de co-expresión de EncA y sfGFP-CLP y purificación por IMAC. MP: Marcador de peso molecular (KDa). 1: proteínas purificadas por IMAC. 2: Fracción soluble de la lisis celular. 3: Fracción insoluble de la lisis celular.

Las células transformantes, seleccionadas con los antibióticos Amp y Kan, se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ con 50% de glicerol. Con las proteínas co-expresadas y purificadas se procedió a su caracterización.

CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEINAS COEXPRESADAS

Los MxNCEs con la sfGFP-CLP como proteína cargamento ensamblados *in vivo* (MxNCEs-sfGFP-CLP) fueron purificados y caracterizados en condiciones nativas, al igual que los MxNCEs sin proteína cargamento (Fig. 20A). De este modo se evita que los nanocompartimentos se desensamblen, no se generan encapsulamientos *in vitro* no deseado y no libera la sfGFP-CLP durante el proceso. Las proteínas obtenidas por IMAC (Fig. 19, carril 1) se purificaron por SEC para separar la proteína libre sfGFP-CLP de los MxNCEs-sfGFP-CLP. El cromatograma muestra que los MxNCEs se encuentran en mayor relación a la sfGFP-CLP (Fig. 20C). La Fig. 20 B nos demuestra la presencia de la proteína sfGFP-CLP en el interior del nanocompartimento purificado. La caracterización de los MxNCEs cargados con la proteína sfGFP-CLP nos muestra que la población de partículas ensambladas *in vivo* tiene tamaños y morfología similares a los MxNCEs ensamblados *in vitro* (Fig. 20 D y E). Es notorio que en el análisis por SDS-PAGE no se observan otras

especies, lo que implica que otras proteínas sin el péptido señal de carga no son encapsuladas de forma importante (Fig. 20B). Con los resultados obtenidos se pudo hacer una comparación y análisis del encapsulamiento de la proteína con el -CLP y del encapsulamiento *in vitro* e *in vivo* como se muestra a continuación.

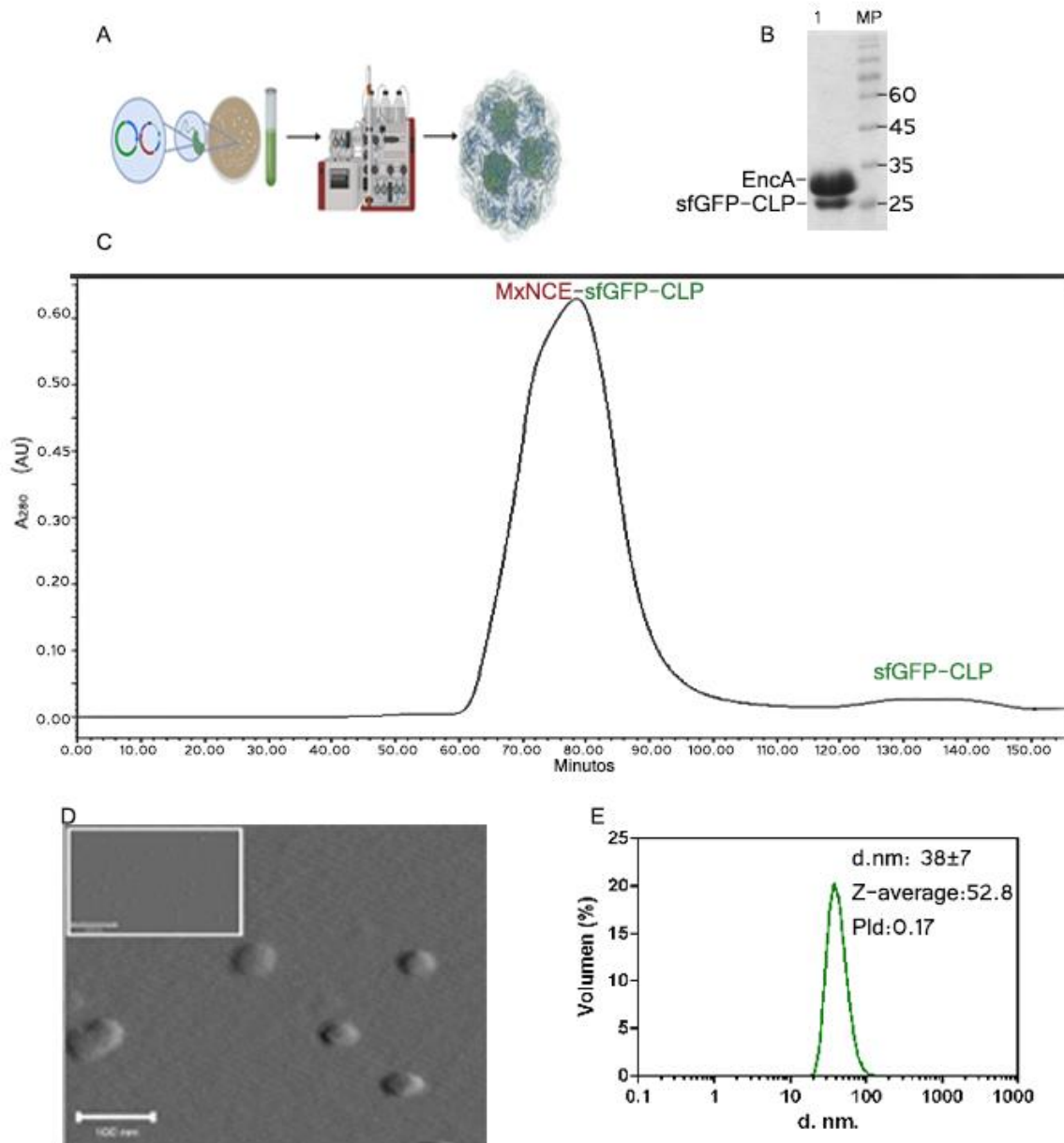


Figura 20. Caracterización del ensamble *in vivo* de MxNCEs con sfGFP-CLP. A) Esquema representativo de expresión y purificación de MxNCEs. B) Análisis por SDS-PAGE de los MxNCEs purificados por SEC, MP: marcador de peso molecular, 1: MxNCEs ensamblados en presencia de sfGFP-CLP. C) Cromatograma de elución de los MxNCEs de purificados por IMAC en la columna Superdex 200 pg. D) Análisis de los MxNCEs cargados con sfGFP-CLP por AFM, donde se observan partículas con tamaños de ~35

nm, barra de escala 100 nm. Inserción, microscopía con menor aumento, barra de escala 500 nm. Imagen adquirida en modo de contacto “tapping amplitude”. E) Diámetro, por DLS, de los MxNCEs cargados con sfGFP-CLP.

EFICIENCIA DE ENCAPSULAMIENTO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE sfGFP EN MxNCEs

La cantidad de proteína heteróloga encapsulada en cada tipo de ensamble de MxNCEs se calculó haciendo uso de las concentraciones de proteína, análisis de densitometría de especies electroforéticas y lecturas de fluorescencia en el caso de las especies que tenían sfGFP encapsulada, como se describe a continuación.

Las lecturas de intensidad de fluorescencia de los MxNCEs ensamblados con sfGFP-CLP o con sfGFP (Fig.21), se interpolaron en una curva de concentración de sfGFP vs. fluorescencia (Fig. 22) y así se estimó la concentración de proteína fluorescente en cada caso. Además, se generó una curva de concentración por densitometría (Anexo 3) con el objetivo de comparar las concentraciones obtenidas por fluorescencia.

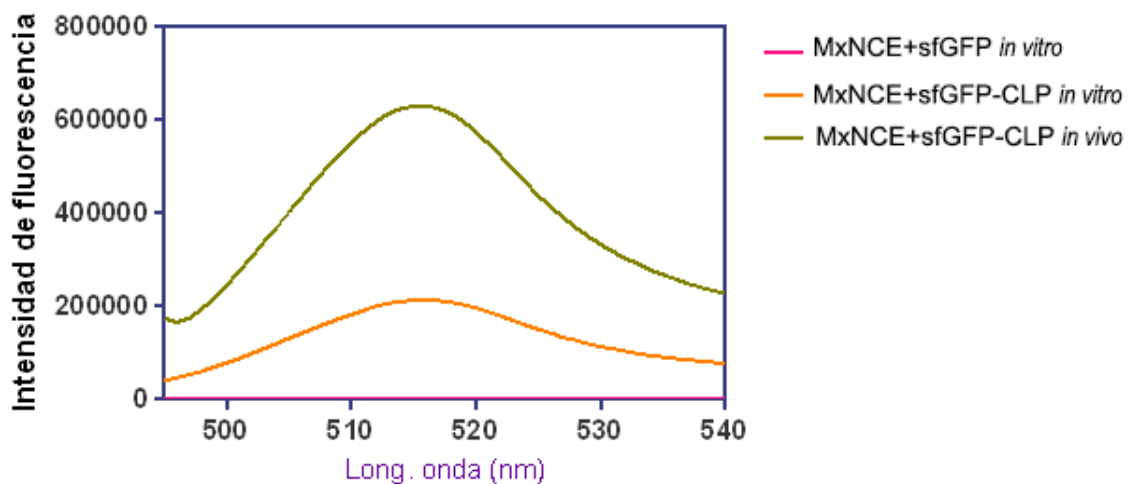


Figura 21. Espectro de fluorescencia (Ext. 485 nm, Ems.495-550 nm) de los ensambles de MxNCE; EncA+sfGFP es el control negativo (línea rosa), MxNCE+GFP-CLP es el reensamble *in vitro* (línea naranja), y EncA+GFP-CLP es el ensamble *in vivo* (línea verde).

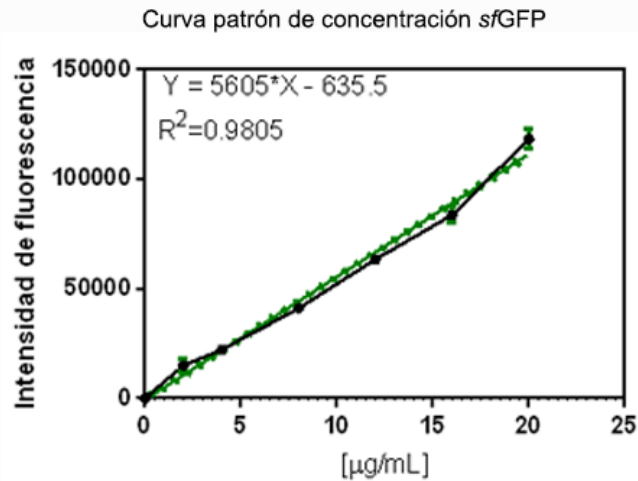


Tabla. Concentración de sfGFP presente en las muestras de los MxNCEs separados por SEC.

Proteína	µg	Intensidad de fluorescencia
MxNCEs + sfGFP-CLP <i>in vivo</i>	29.8	65092.67
	28.6	62554.00
	29.6	64690.40
MxNCEs + sfGFP-CLP <i>in vitro</i>	7.4	15984.00
	3.0	6509.26
	3.0	6225.07
MxNCEs+sfGFP <i>in vitro</i> *	1.0	2048.00

* Este experimento no cuenta con repeticiones

Figura 22. Curva patrón generada por la intensidad de fluorescencia de la proteína sfGFP. los datos interpolados se muestran en la tabla, donde EncA+sfGFP es el control negativo de encapsulamiento, EncA+sfGFP-CLP es el reensamble *in vitro*, y EncA+sfGFP-CLP es el ensamble *in vivo*, las lecturas de cada ensamble se realizaron por triplicado.

Para generar las relaciones molares que se muestran en la Tabla 4, se cuantificó por BCA la concentración total de proteína, se restó la concentración de sfGFP-CLP, obtenida con la curva patrón de concentración de sfGFP por fluorescencia (Fig. 22). Posteriormente se calculó la masa de estas proteínas en nanomoles (nmol). Finalmente, se obtuvo la relación molar al comparar las distintas masas de EncA y proteína fluorescente para estimar cuántas moléculas de sfGFP había dentro de cada MxNCE.

Extrapolando los resultados de los cálculos y mediciones de concentraciones tenemos que por cada nmol de MxNCEs reensamblado *in vitro*, hay 25 nmoles de la proteína cargamento sfGFP-CLP. *In vivo*, la capacidad de encapsulamiento aumenta considerablemente a 36 nmoles por cada nmol de MxNCEs, esto sin considerar la facilidad metodológica del encapsulamiento *in vivo*. Por otra parte, la capacidad de encapsulamiento de la sfGFP carente del péptido señal de encapsulamiento (CLP), es solamente 3 moléculas por MxNCE (Tabla 4).

Siendo que el volumen interno de un MxNCE es de $\sim 9,416,803 \text{ \AA}^3$, considerando un radio interno de 131 \AA , mientras que el volumen estimado de la sfGFP es de $\sim 100,061 \text{ \AA}^3$, considerando que fuese una esfera con radio de 28.8 \AA . Esto implica que dentro de cada MxNCE podrían caber hasta ~ 94 moléculas de sfGFP, sin considerar los intersticios entre ellas. Sin embargo, teniendo en cuenta que solo la superficie interna de la partícula es capaz de interactuar con el CLP y que deben existir espacios entre las moléculas de sfGFP, el número de moléculas encapsuladas debe ser menor, como los resultados obtenidos en nuestro trabajo (Tabla 4).

Considerando que el MxNCE nativo encapsula un total de 177 proteínas cargamento nativas, entre ellas 36 mol de EncB (17 KDa), 94 mol de EncC (13 KDa) y 47 mol de EncD (11 KDa) a través del CLP localizado en el extremo C-terminal, da como resultado una relación molar de 1:1 (EncA:proteína cargamento) siendo esta relación el 100% de eficiencia del encapsulamiento. Al comparar las eficiencias obtenidas del encapsulamiento de la proteína heteróloga sfGFP-CLP (30 KDa) en MxNCE obtenemos un 14% y 20% de eficiencia de encapsulamiento *in vitro* e *in vivo* respectivamente, según las relaciones molares. Sin embargo al ser la sfGFP-CLP una proteína con un tamaño y volumen mayor al de las proteínas cargamento nativas se estima que la disminución de la eficiencia pueda deberse a efectos estéricos negativos durante el proceso de carga y ensamblaje del cascarón (EncA), además un factor probable de la disminución de la eficiencia de carga es la naturaleza heteróloga de la sfGFP-CLP, proteína que no se encuentra optimizada evolutivamente para su encapsulación (Altenburg et al., 2021). Snijder y colaboradores en el 2016 plantearon que la unión subestequiométrica del cargamento dentro del NCE es una cuestión de estabilidad global de la cápside y la unión completa del cargamento frustra mecánicamente la formación de esta y rompe su simetría. Por lo anterior, podríamos conceptualizar el dato previsto de 94 moléculas de sfGFP-CLP como el 100% de eficiencia de encapsulamiento, donde a la sfGFP-CLP se le considera como una esfera volumétrica con relación al volumen interno del MxNCE, sin la existencia de impedimento estérico y la disponibilidad de todos

los sitios de interacción al interior del MxCNE (180, uno por cada EncA). Siendo 94 moléculas de sfGFP-CLP al interior del MxNCE el 100% de eficiencia: en el presente trabajo tenemos una eficiencia de encapsulamiento del 26% y 38% para los ensambles *in vitro* e *in vivo* del MxNCE respectivamente. La presencia del CLP en el extremo carboxilo terminal del cargamento genera procesos de encapsulamiento eficientes según los porcentajes previamente descritos, y esto lo podemos distinguir gracias al bajo encapsulamiento *in vitro* de la sfGFP sin el CLP en el MxNCE, con un 2% de eficiencia si respecto a la eficiencia de encapsulamiento de proteínas cargamento nativas y del 3% comparado con el espacio volumétrico interno disponible en el MxNCE, según el volumen de la sfGFP.

Hacer la comparación de la eficiencia de encapsulamiento entre los diferentes NCE con cargamentos de distinta naturaleza no es una labor sencilla ya que por lo descrito en la literatura la eficiencia de encapsulamiento disminuye o aumenta dependiendo del número de sitios disponibles de interacción CLP- encapsulina: NCE de geometría T=1 tendrán menos sitios de interacción (60 sitios) respecto a NCE con geometría T=3 (180 sitios) y por ende un aumento en el volumen interno del NCE, un ejemplo de estos eventos es el encapsulamiento de la sfGFP por *T. maritima* (T=1, 60 subunidades) donde por cada 6 encapsulinas en promedio habrá una molécula de sfGFP (Anexo 1, Tabla 2) comparable con nuestros resultados donde por cada 5 o 7 moléculas de EncA habrá una de sfGFP (Tabla 4). Sin embargo en el sentido del NCE ensamblado es más eficiente el NCE formado por EncA (MxNCE) que el NCE de *T. maritima*, pues por ensamble del MxNCE habrá en el interior un promedio de 30 moléculas de sfGFP, mientras que en el NCE de *T. maritima* habrá aproximadamente 14 moléculas sfGFP cargamento. Otro factor a considerar es la estructura y oligomerización del cargamento, por ejemplo: el NCE de *B. linens* (T=1, 60 subunidades) encapsula 1 hexámero de la proteína cargamento nativa DyP (dye-decolorizing peroxidases, por sus siglas en inglés) (240KDa) mientras que este mismo NCE encapsula de 10 a 12 moléculas de sfGFP como proteína heteróloga, donde, el aumento de la eficiencia de encapsulamiento del mismo NCE pero con diferente proteína cargamento puede ser debido a la mejor distribución espacial que puede llegar a tener la sfGFP en la superficie interna del

NCE y a los impedimentos estéticos que podría causar cargar más de un hexámero de DyP (Anexo 1, Tabla 2).

Al comparar nuestros resultados de eficiencia de encapsulamiento de la sfGFP con los de Alternburg y colaboradores en el 2021, donde definen el 100 % de eficiencia de encapsulamiento en base a los sitios de unión del CLP (180 para MxNCE), encontramos semejanza en el porcentaje (20%) para los ensambles *in vivo* del MxNCE mientras que disminuye el porcentaje de encapsulamiento respecto a nuestro ensamble *in vitro* (14 %), además ellos hacen la comparación experimental de encapsulamiento de la sfGFP por los NCE de *T. maritima* y de MxNCE, encontrando que el porcentaje es mucho mayor para MxNCE.

Es así como podemos considerar a los NCE como sistemas capaces de encapsular porque se ha visto que la encapsulación de la carga precede a la terminación de la cápside, sin embargo la carga dependerá en última instancia del tamaño de la proteína cargamento y de los diferentes tamaños y organizaciones geométricas de los NCEs.

Tabla 4. Resumen de caracterización de MxNCEs ensamblados *in vivo* e *in vitro*.

<i>Proteína</i>	Diámetro por DLS (nm)	Diámetro por AFM/TEM (nm)	Eficiencia de reensamble (%)	Relación molar EncA:sfGFP	Relación MxNCE:sfGFP
<i>EncA</i> (Control)	36 ± 5	33 ± 4	---	1:0	1:0
<i>EncA</i> (Reensamble)	45 ± 18	31 ± 6	75 ± 5	1:0	1:0
<i>EncA/sfGFP</i> (<i>in vitro</i>)	37 ± 17	42 ± 10	70*	50:1	1: ~3
<i>EncA/sfGFP-CLP</i> (<i>in vitro</i>)	36 ± 14	39 ± 11	80 ± 7	7:1	1: ~25
<i>EncA/sfGFP-CLP</i> (<i>in vivo</i>)	35 ± 5	34 ± 5	---	5:1	1: ~36

* Estos experimentos no cuentan con repeticiones.

Con nuestros resultados de encapsulamiento se puede corroborar que los NCEs de *M. xanthus* presentan procesos reversibles de ensamble y desensamble del nanocompartimento, similar a los nanocompartimentos de otras especies (Cassidy-Amstutz et al., 2016; Rahmanpour & Bugg, 2013). Este trabajo representa para nuestro grupo la primera pauta del uso de nanocompartimentos, siendo el modelo de estudio las encapsulinas de *M. xanthus* pues al ser sistemas que se pueden plegar *in vitro* bajo condiciones controladas y cuentan con un sistema de encapsulamiento específico posibilitan el encapsulamiento de varias moléculas de diferente naturaleza, sin comprometer el ensamble del nanocompartimento. (Anexo 1).

CONCLUSIONES

1. La proteína recombinante EncA se expresó eficientemente en *E. coli* BL21(DE3) en la fracción soluble, y gracias a la etiqueta de 6xHis se purificaron fracciones de proteína ensamblada en NCEs con alta pureza y rendimiento. Esto implica que al menos una fracción de los extremos C-terminales de EncA se encuentran en la superficie de estas nanopartículas.
2. El agente caotrópico HClGnd (4 M) puede desensamblar la capsulina formando partículas de un menor tamaño al de las partículas nativas. El reensamble *in vitro*, bajo las condiciones de desensamble con HClGnd 4 M y reensamble en presencia de L-Arg 0.3 M como estabilizante presenta una eficiencia > 70%.
3. El estudio de los MxNCEs en diferentes medios desnaturizantes nos permitió conocer en qué condiciones pueden tener una mayor estabilidad, así como las mejores condiciones para desensamblar el nanocompartimento para cargarlo con proteínas heterólogas, esto fue a pH 7.4, 37 °C y 4 M de HClGnd.
4. Los estudios estructurales de desensamble y reensamble por anisotropía y CD nos permitieron conocer el punto de inflexión para la pérdida de estructura de los MxNCEs cuando la proteína se encuentra en concentraciones altas de HClGnd.
5. Los reensambles de los MxNCEs con sfGFP-CLP presentan estructuras características de los nanocompartimentos nativos, la presencia de la sfGFP-CLP en el medio de reensamble no representa un factor que altere el reensamble de los nanocompartimentos, y la presencia del péptido CLP aumenta notablemente la eficiencia de encapsulamiento.
6. Los NCEs pueden ensamblarse *in vivo* y encapsular proteínas heterólogas siempre y cuando presenten el CLP. Además, estos ensamblajes son más eficientes que el encapsulado *in vitro* y el nanocompartimento presenta una mayor estabilidad y homogeneidad en su diámetro.

7. Con el encapsulamiento *in vivo* e *in vitro* de la proteína sfGFP unida al péptido CLP, se confirmó que el encapsulamiento de la proteína está favorecido por el péptido de cargamento.

PERSPECTIVAS

1. El péptido CLP es un determinante para el encapsulamiento eficiente de proteínas en los MxNCEs, tanto *in vivo* como *in vitro*. Encapsular moléculas con características y funciones específicas dentro del nanocompartimento será importante en la funcionalización del nanocompartimento. La fusión de proteínas o compuestos de interés biomédico o biotecnológico con el CLP permitirían su encapsulamiento, ya sea *in vivo* o *in vitro*.
2. Evaluar la estabilidad de los MxNCEs cargados con moléculas heterólogas funcionales, al permanecer como nanopartículas cargadas estables se les consideraría como potenciales vectores.
3. Estos MxNCEs podrían ser un excelente vector para el transporte de biofármacos o fármacos tradicionales, el cual habría que dirigirlo a tejidos específicos mediante la modificación de su superficie.
4. Es necesario caracterizar la eficiencia del intercambio del medio con el interior de los MxNCEs para establecer su capacidad de liberación e intercambio en condiciones tisulares.
5. Con proteínas o moléculas funcionales dirigidas por el péptido CLP para su encapsulamiento, caracterizar la eficiencia del intercambio del medio con el interior del nanocompartimento, su capacidad de liberación e intercambio.
6. Los MxNCEs son un modelo interesante de contenedor para enzimas con el fin de construir nanobiocatalizadores. Valdría la pena estudiar su capacidad de intercambiar sustratos y productos con el medio.

REFERENCIAS

- Akita, F., Chong, K. T., Tanaka, H., Yamashita, E., Miyazaki, N., Nakaishi, Y., ... Nakagawa, A. (2007). The Crystal Structure of a Virus-like Particle from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* Provides Insight into the Evolution of Viruses. *Journal of Molecular Biology*, *368*(5), 1469–1483. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.02.075>
- Allison, D. P., Hinterdorfer, P., & Han, W. (2002). Biomolecular force measurements and the atomic force microscope. *Current Opinion in Biotechnology*, *13*(1), 47–51. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00283-5](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00283-5)
- Bae, Y., Kim, G. J., Kim, H., Park, S. G., Jung, H. S., & Kang, S. (2018). Engineering Tunable Dual Functional Protein Cage Nanoparticles Using Bacterial Superglue. *Biomacromolecules*, *19*(7), 2896–2904. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00457>
- Cao, B., Xu, H., & Mao, C. (2011). Transmission electron microscopy as a tool to image bioinorganic nanohybrids: The case of phage-gold nanocomposites. *Microscopy Research and Technique*, *74*(7), 627–635. <https://doi.org/10.1002/jemt.21030>
- Cassidy-Amstutz, C., Oltrogge, L., Going, C. C., Lee, A., Teng, P., Quintanilla, D., ... Savage, D. F. (2016). Identification of a Minimal Peptide Tag for in Vivo and in Vitro Loading of Encapsulin. *Biochemistry*, *55*(24), 3461–3468. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00294>
- Demchuk, A. M., & Patel, T. R. (2020). The biomedical and bioengineering potential of protein nanocompartments. *Biotechnology Advances*, *41*(September 2019), 107547. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107547>
- Diaz, D., Care, A., & Sunna, A. (2018). Bioengineering strategies for protein-based nanoparticles. *Genes*, *9*(7). <https://doi.org/10.3390/genes9070370>
- Diaz, D., Vidal, X., Sunna, A., & Care, A. (2021). Bioengineering a Light-Responsive Encapsulin Nanoreactor: A Potential Tool for In Vitro Photodynamic Therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *13*(7), 7977–7986. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c21141>
- Dubach, V. (2019). *Encapsulins, a new versatile class of nanocompartments and its applications in biotechnology*. University of Southampton.
- Duda, R. L., & Teschke, C. M. (2019). The amazing HK97 fold: versatile results of modest differences. *Current Opinion in Virology*, *36*, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2019.02.001>
- Gabashvili, A. N., Chmelyuk, N. S., Efremova, M. V., Malinovskaya, J. A., Semkina, A. S., & Abakumov, M. A. (2020). Encapsulins—bacterial protein nanocompartments: Structure, properties, and application. *Biomolecules*, *10*(6), 1–12. <https://doi.org/10.3390/Biom10060966>
- Giessen, T. W. (2016). ScienceDirect Encapsulins : microbial nanocompartments with applications in biomedicine , nanobiotechnology and materials science. *Current Opinion in Chemical Biology*, *34*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.05.013>
- Giessen, T. W., Orlando, B. J., Verdegaal, A. A., Chambers, M. G., Gardener, J., Bell, D. C., ... Silver, P. A. (2019). Large protein organelles form a new iron sequestration system with high storage capacity. *eLife*, *8*, 1–23. <https://doi.org/10.7554/eLife.46070>

- Giessen, T. W., & Silver, P. A. (2016). Converting a Natural Protein Compartment into a Nanofactory for the Size-Constrained Synthesis of Antimicrobial Silver Nanoparticles. *ACS Synthetic Biology*, 5(12), 1497–1504. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00117>
- Giessen, T. W., & Silver, P. A. (2017a). Widespread distribution of encapsulin nanocompartments reveals functional diversity. *Nature Microbiology*, 2(March), 1–11. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.29>
- Giessen, T. W., & Silver, P. A. (2017b). Widespread distribution of encapsulin nanocompartments reveals functional diversity. *Nature Microbiology*, 2(March), 1–11. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.29>
- He, D., Hughes, S., Vanden-Hehir, S., Georgiev, A., Altenbach, K., Tarrant, E., ... Marles-Wright, J. (2016). Structural characterization of encapsulated ferritin provides insight into iron storage in bacterial nanocompartments. *eLife*, 5, 0–31. <https://doi.org/10.7554/eLife.18972>
- Jones, J. A., & Giessen, T. W. (2020). Advances in encapsulin nanocompartment biology and engineering. *Biotechnology and Bioengineering*, (May), 1–15. <https://doi.org/10.1002/bit.27564>
- Kayser, O., Lemke, A., & Hernandez-Trejo, N. (2005). The Impact of Nanobiotechnology on the Development of New Drug Delivery Systems. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 6(1), 3–5. <https://doi.org/10.2174/1389201053167158>
- Kelly, S. M., Jess, T. J., & Price, N. C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1751(2), 119–139. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.06.005>
- Kerfeld, C. A., Aussignargues, C., Zarzycki, J., Cai, F., & Sutter, M. (2018). Bacterial microcompartments. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 277–290. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.10>
- Kim, D., Choi, J., Lee, S., Hyun, H., Lee, K., & Cho, K. (2019). Mutants defective in the production of encapsulin show a tan-phase-locked phenotype in *Myxococcus xanthus*. *Journal of Microbiology*, 57(9), 795–802. <https://doi.org/10.1007/s12275-019-8683-9>
- Krupovic, M., & Koonin, E. V. (2017). Multiple origins of viral capsid proteins from cellular ancestors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(12), E2401–E2410. <https://doi.org/10.1073/pnas.1621061114>
- Künzle, M., Mangler, J., Lach, M., & Beck, T. (2018). Peptide-directed encapsulation of inorganic nanoparticles into protein containers. *Nanoscale*, 10(48), 22917–22926. <https://doi.org/10.1039/C8NR06236F>
- Lagoutte, P., Mignon, C., Stadthagen, G., Potisopon, S., Donnat, S., Mast, J., ... Werle, B. (2018). Simultaneous surface display and cargo loading of encapsulin nanocompartments and their use for rational vaccine design. *Vaccine*, 36(25), 3622–3628. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.05.034>
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. (J. R. Lakowicz, Ed.), *Geofisica Pura e Applicata* (Vol. 33). Boston, MA: Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>
- Lau, Y. H., Giessen, T. W., Altenburg, W. J., & Silver, P. A. (2018). Prokaryotic nanocompartments

- form synthetic organelles in a eukaryote. *Nature Communications*, 9(1), 1311. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03768-x>
- Li, H., Zheng, G., & Zhu, S. (2018). Construction of an organelle-like nanodevice via supramolecular self-assembly for robust biocatalysts. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0873-3>
- Lončar, N., Rozeboom, H. J., Franken, L. E., Stuart, M. C. A., & Fraaije, M. W. (2020). Structure of a robust bacterial protein cage and its application as a versatile biocatalytic platform through enzyme encapsulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 529(3), 548–553. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.06.059>
- McHugh, C. A., Fontana, J., Nemecek, D., Cheng, N., Aksyuk, A. A., Heymann, J. B., ... Hoiczyk, E. (2014). A virus capsid-like nanocompartment that stores iron and protects bacteria from oxidative stress, 33(17), 1896–1912.
- McHugh, C. A., Fontana, J., Nemecek, D., Cheng, N., Aksyuk, A. A., Heymann, J. B., ... Hoiczyk, E. (2014). A virus capsid-like nanocompartment that stores iron and protects bacteria from oxidative stress. *The EMBO Journal*, 33(17), 1896–1911. <https://doi.org/10.15252/emj.201488566>
- Misra, P. (2015). *Applied Spectroscopy and the Science of Nanomaterials* (Vol. 2). Retrieved from <http://link.springer.com/10.1007/978-981-287-242-5>
- Moon, H., Lee, J., Kim, H., Heo, S., Min, J., & Kang, S. (2014). Genetically engineering encapsulin protein cage nanoparticle as a SCC-7 cell targeting optical nanoprobe. *Biomaterials Research*, 18(1), 21. <https://doi.org/10.1186/2055-7124-18-21>
- Moon, H., Lee, J., Min, J., & Kang, S. (2014). Developing genetically engineered encapsulin protein cage nanoparticles as a targeted delivery nanoplatform. *Biomacromolecules*, 15(10), 3794–3801. <https://doi.org/10.1021/bm501066m>
- Nichols, R. J., Cassidy-Amstutz, C., Chaijarasphong, T., & Savage, D. F. (2017). Encapsulins: molecular biology of the shell. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 52(5), 583–594. <https://doi.org/10.1080/10409238.2017.1337709>
- Nichols, R. J., Cassidy-amstutz, C., Chaijarasphong, T., Savage, D. F., Nichols, R. J., Cassidy-amstutz, C., & Chaijarasphong, T. (2017). Encapsulins: molecular biology of the shell, 9238. <https://doi.org/10.1080/10409238.2017.1337709>
- Putri, R. M., Allende-Ballester, C., Luque, D., Klem, R., Rousou, K. A., Liu, A., ... Cornelissen, J. J. L. M. (2017). Structural Characterization of Native and Modified Encapsulins as Nanoplatforms for in Vitro Catalysis and Cellular Uptake. *ACS Nano*, 11(12), 12796–12804. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b07669>
- Putri, R. M., Allende-ballester, C., Luque, D., Klem, R., Rousou, K., Liu, A., ... Casto, J. R. (2017). Structural Characterization of Native and Modified Encapsulins as Nanoplatforms for in Vitro Catalysis and Cellular Uptake †. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b07669>
- Raeeszadeh-Sarmazdeh, M., Hartzell, E., Price, J. V., & Chen, W. (2016). Protein nanoparticles as multifunctional biocatalysts and health assessment sensors. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 13, 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2016.08.016>

- Rahmanpour, R., & Bugg, T. D. H. (2013). Assembly in vitro of *Rhodococcus jostii* RHA1 encapsulin and peroxidase DypB to form a nanocompartment. *FEBS Journal*, 280(9), 2097–2104. <https://doi.org/10.1111/febs.12234>
- Ren, H., Zhu, S., & Zheng, G. (2019). Nanoreactor design based on self-assembling protein nanocages. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 25–27. <https://doi.org/10.3390/ijms20030592>
- Sasaki, E., Böhringer, D., Van De Waterbeemd, M., Leibundgut, M., Zschoche, R., Heck, A. J. R., ... Hilvert, D. (2017). Sasaki, E., Böhringer, D., Van De Waterbeemd, M., Leibundgut, M., Zschoche, R., Heck, A. J. R., ... Hilvert, D. (2017). Structure and assembly of scalable porous protein cages. *Nature Communications*, 8, 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms14663> Structure and. *Nature Communications*, 8, 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms14663>
- Sigmund, F., Massner, C., Erdmann, P., Stelzl, A., Rolbieski, H., Desai, M., ... Westmeyer, G. G. (2018). Bacterial encapsulins as orthogonal compartments for mammalian cell engineering. *Nature Communications*, 9(1), 1990. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04227-3>
- Silva, L. (2005). Imaging Proteins with Atomic Force Microscopy: An Overview. *Current Protein & Peptide Science*, 6(4), 387–395. <https://doi.org/10.2174/1389203054546389>
- Snijder, J., Kononova, O., Barbu, I. M., Uetrecht, C., Rurup, W. F., Burnley, R. J., ... Heck, A. J. R. (2016). Assembly and mechanical properties of the cargo-free and cargo-loaded bacterial nanocompartment encapsulin. *Biomacromolecules*, 17(8), 2522–2529. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b00469>
- Sonotaki, S., Takami, T., Noguchi, K., Odaka, M., Yohda, M., & Murakami, Y. (2017). Successful PEGylation of hollow encapsulin nanoparticles from: *Rhodococcus erythropolis* N771 without affecting their disassembly and reassembly properties. *Biomaterials Science*, 5(6), 1082–1089. <https://doi.org/10.1039/c7bm00207f>
- Suhanovsky, M. M., & Teschke, C. M. (2015). Nature's favorite building block : Deciphering folding and capsid assembly of proteins with the HK97-fold. *Virology*, 479–480, 487–497. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.055>
- Sutter, M., Boehringer, D., Gutmann, S., Günther, S., Prangishvili, D., Loessner, M. J., ... Ban, N. (2008). Structural basis of enzyme encapsulation into a bacterial nanocompartment. *Nature Structural and Molecular Biology*, 15(9), 939–947. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1473>
- Tracey, J. C., Coronado, M., Giessen, T. W., Lau, M. C. Y., Silver, P. A., & Ward, B. B. (2019). The Discovery of Twenty-Eight New Encapsulin Sequences, Including Three in Anammox Bacteria. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56533-5>
- Wilkins, D. K., Grimshaw, S. B., Receveur, V., Dobson, C. M., Jones, J. A., & Smith, L. J. (1999). Hydrodynamic Radii of Native and Denatured Proteins Measured by Pulse Field Gradient NMR Techniques †. *Biochemistry*, 38(50), 16424–16431. <https://doi.org/10.1021/bi991765q>
- Williams, D. B., & Carter, C. B. (2009). The transmission electron microscope. In *Transmission Electron Microscopy* (pp. 3–22).
- Williams, E. M., Jung, S. M., Coffman, J. L., & Lutz, S. (2018). Pore Engineering for Enhanced Mass Transport in Encapsulin Nanocompartments. *ACS Synthetic Biology*, 7(11), 2514–2517. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00295>

Xing, C., Fan, Y., Chen, X., Guo, J., Shen, Y., Yan, P., ... Chen, Y. (2020). Science of the Total Environment A self-assembled nanocompartment in anammox bacteria for resisting intracellular hydroxylamine stress. *Science of the Total Environment*, 717, 137030. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137030>

ANEXOS

Anexo 1

Tabla 1. Modificaciones y aplicaciones biotecnológicas de las encapsulinas.

Encapsulina y organismo	Modificación de la encapsulina	Potencial de aplicación	Ref.
EncMh de <i>Mycolicibacterium hassiacum</i>	Coexpresión encapsulina con diferentes enzimas: catalasa, monoxidasas, oxidasas y peroxidasas con el CLP en el carboxilo terminal.	Biocatalizador en producción de lignina insoluble con la enzima peroxidasa como cargamento	(Lončar et al., 2020)
EncTm de <i>Thermotoga maritima</i>	Se modificó el interior del NCE. Por modificación genética se fusionó el gen del péptido AG4 para precipitación de la plata, en el aminoterminal al interior de la nanopartícula.	Nanoreactor para la producción de nanopartículas de plata antimicrobianas. El péptido AG4 permite la precipitación de la plata y mineralización de la plata.	(Giessen & Silver, 2016)
Anammox bacterias	Coexpresión del gen de encapsulina de las bacterias anamox y el gen hidroxil- amino oxido reductasa (HAO) de <i>Brocadia fulgida</i> . Fusión en el amino terminal de HAO-Enc	Tratamiento de aguas residuales	(Xing et al., 2020)
EncTm <i>Thermotoga maritima</i>	CLP fusionados con nanopartícula de oro	Contenedor de electrolitos en cultivos celulares	(Künzle et al., 2018)
<i>T. maritima</i>	Ligación de mini-Singlet Oxygen Generator (miniSOG) a una secuencia blanco para la unión a la superficie interna del NCE modificada	Terapia fotodinámica; biomedicina y biotecnología	(Diaz, Vidal, Sunna, & Care, 2021)
<i>T. maritima</i>	Modificación en la superficie del nanocompartimento unido a un péptido	Sistema Tera gnóstico	(Moon, Lee, Kim, et al., 2014)
<i>T. maritima</i>	Modificación en el N-terminal y delección o cambio de los aa formadores del poro	Almacenamientos de lantánidos	(E. M. Williams et al., 2018)
<i>B. linens</i>	Modificación del cargamento	Reacciones en cadena biorreactor	(Putri, Allende-ballester, et al., 2017)

<i>T. maritima</i>	Modificación en la superficie unión de péptido en la secuencia	Nanoestructuras multifuncionales de entrega	(Moon, Lee, Min, & Kang, 2014)
<i>T. maritima</i>	Modificación genética, en la superficie del nanocompartimento	Diseño de vacunas y presentación de antígenos	(Lagoutte et al., 2018)
<i>T. maritima</i>	Inserción genética en la superficie para el uso del sistema SpyTag-SpyCatcher	Diseños multifuncionales de entrega.	(Bae et al., 2018)

Tabla 2. Capacidad de encapsulamiento de los NCEs de diferentes organismos

Encapsulinas y organismo	Características del NCE (diámetro, n T)	Características del cargamento	Relación molar	Referencia
<i>Enc BI B. linens</i>	T=1 60 sub unidades, 25 d.nm	GFP monómero	10-12 copias por nanocompartimento	(Putri, Allende-ballester, et al., 2017)
<i>T. maritima</i>	T=1 60 sub 24 d.nm	profármaco 6-maleimidocaproil hidrazona de la doxorubicina (AIDox)	1 molécula de AIDox por subunidad (60 moléculas de AIDox por nanocompartimento)	(Moon, Lee, Min, et al., 2014)
<i>Sporichthya polymorpha</i>	T=1 60 subunidades	Hemeritinas	20 moléculas de hemeritina por nanocompartimento	(Giessen & Silver, 2017b)
<i>Bacillaceae bacterium</i>	T=3 180 subunidades	IMEF (Proteínas encargadas a la mineralización del hierro, asociados a cargamentos de Fermicutes) En dímeros y monómeros	150 moléculas de IMEF por nanocompartimento	(Giessen & Silver, 2017b)
<i>Kuenenia stuttgartiensis</i>	T=3 180 subunidades	NIR (Nitrato Reductasa) monómeros	30-35 moléculas de NIR por nanocompartimento	(Giessen & Silver, 2017b)
<i>T. maritima</i>	T=1 60 subunidades	GFP (proteína verde fluorescente) monómeros	~30 moléculas de GFP por nanocompartimento	(Lagoutte et al., 2018)
<i>T. maritima</i>	T=1 60 subunidades	GFP	8-14 moléculas de GFP por nanocompartimento	(Cassidy-Amstutz et al., 2016)
<i>T. maritima</i>	T=1 60	miniSOG (Generadores de oxígeno derivados de Fototropin-2)	~7±2 moléculas de miniSOG por nanocompartimento	(Diaz et al., 2021)

Anexo 2

Anexo 2.1

Protocolo para la preparación de células quimiocompetentes

1. Se creció un preinóculo, del cultivo de interés, por 12 h de 10 mL de medio líquido LB- sin antibiótico.
2. Se diluyo el preinóculo 1:100 en 50 mL de medio líquido LB-sin antibiótico y 15% de glicerol.
3. Se incubó en agitación constante a 37° C que se obtuvo 0.4 de DO₆₀₀.
4. Se retiró la incubación y se colocó el matraz en hielo por 15 min.
5. Se cosecharon las células por centrifugación a 600 rpm por 5 min a 4 °C.
6. Se decantó el medio y se resuspendieron las células en el volumen original del amortiguador frío de CaCl₂ (75 mM de CaCl₂), se dejó reposando en hielo durante 3 min.
7. Se realizó un segundo lavado repitiendo los pasos 5 y6.
8. Se cosecharon las células nuevamente, se decantó el medio.
9. Se resuspendieron las células en 3 mL del amortiguador frío de CaCl₂ y se dejó reposar en hielo durante 15 min.
10. Se tomaron alícuotas de 50µL en Eppendorf de 600µL.
11. Para su uso posterior, se congelaron las alícuotas en un baño frío de metanol y posteriormente se almacenaron a -70 °C.

Anexo 2.2

Tabla 2. 2. Puntos de Curva patrón para su cuantificación por BSA

Muestra	Dilución	Volumen µl	agua µl	SDS 10%	Abs 562 nm	Concentración mg/ml
			45	5		0
BSA	1mg/ml	4.0	41	5		0.004
BSA	1 mg/ml	8.0	37	5		0.008
BSA	1 mg/ml	8.0	37	5		0.008
BSA	1 mg/ml	16.0	29	5		0.016
BSA	1 mg/ml	32.0	13	5		0.032
BSA	1 mg/ml	32.0	13	5		0.032
BSA	1 mg/ml	40.0	5	5		0.04

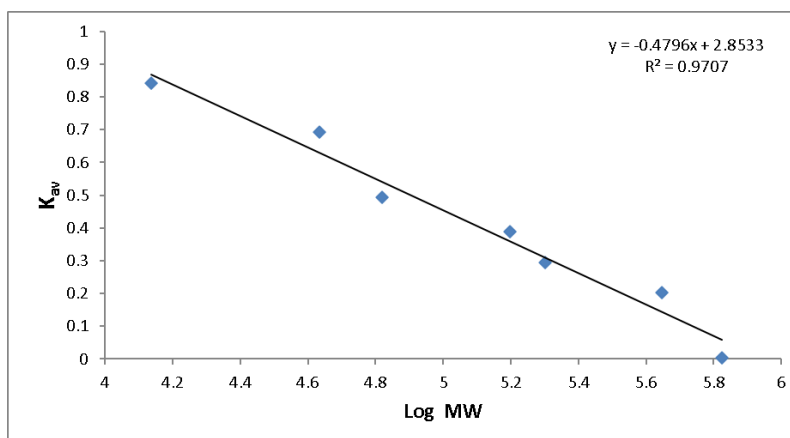
Anexo 2.3

Curva de calibración para la columna Superdex 200 16/600 pg (Gráfica 2.3). Para esta se utilizaron las proteínas estándar de la tabla 2.3 y se graficó el avance las proteínas por la columna (K_{av} , definida por $K_{av} = (V_e - V_0)/(V_c - V_0)$, donde V_e = volumen de elución, V_0 = volumen muerto y V_c = volumen de la columna).

Tabla 2.3. En la tabla se muestran las proteínas estándar, el volumen en el que eluyeron y los patrones de avance en la columna.

Proteína estándar	MW (Da)	log MW	V_e (mL)	K_{av}
Blue dextran	2000000	---	45.4	
Tyroglobulin	669000	5.82	45.6	0.0028
Apoferritin	443000	5.65	61.1	0.2016
β -amilase	200000	5.30	68.2	0.2937
IgG	158000	5.20	75.7	0.3894
Albumin	66000	4.82	83.8	0.4940
Ovoalbumin	43000	4.63	99.3	0.6940
Ribonuclease A	13700	4.14	110.8	0.8416

Gráfica 2.3. En la gráfica se observa el K_{av} contra el peso molecular de la proteína estándar en escala logarítmica.



Anexo 3

3.1 PERFILES DE PURIFICACIÓN DE EncA Y sfGFP-CLP

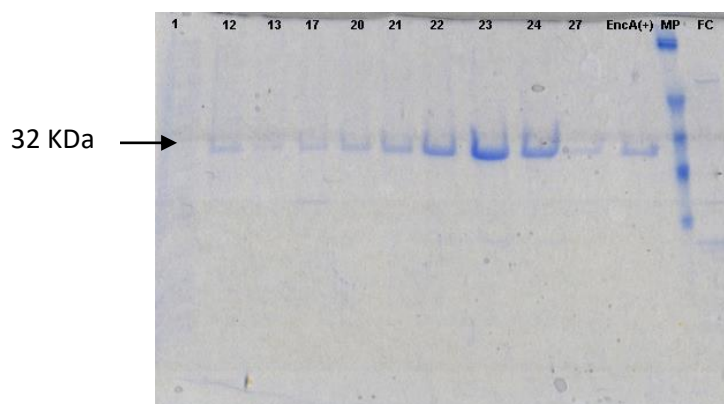


Figura 1. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE de las fracciones de purificación de EncA (32 KDa). El número que presentan los carriles en la parte superior corresponden al número de la fracción resultado de la purificación. MP es el marcador de peso molecular, EncA (+) es una muestra previamente purificada y caracterizada como control positivo y FC es el frente de elución.

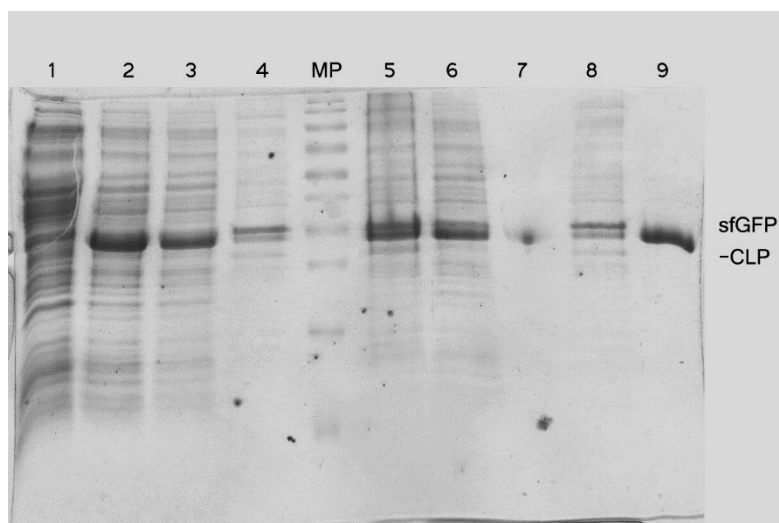


Figura 2. Gel de poliacrilamida SDS-PAGE de las fracciones de purificación de sfGFP-CLP y sfGFP (30 KDa). MP es el marcador de peso molecular, 1: Control de sobreexpresión sin inductor, sfGFP, 2: Fracción soluble de sobreexpresión, sfGFP. 3: Fracción insoluble de la sobreexpresión, sfGFP. 4: Fracciones 17-22 del cromatograma. 5: Fracción soluble de sobreexpresión, sfGFP-CLP. 6: Fracción insoluble de la sobreexpresión, sfGFP-CLP. 7: Control

de sobreexpresión sin inductor, sfGFP-CLP. 8: Fracciones 17-20 del cromatograma. 9: Fracciones 21-24 del cromatograma.

3.2 Curva de patrón de concentración de sfGFP por densitometría

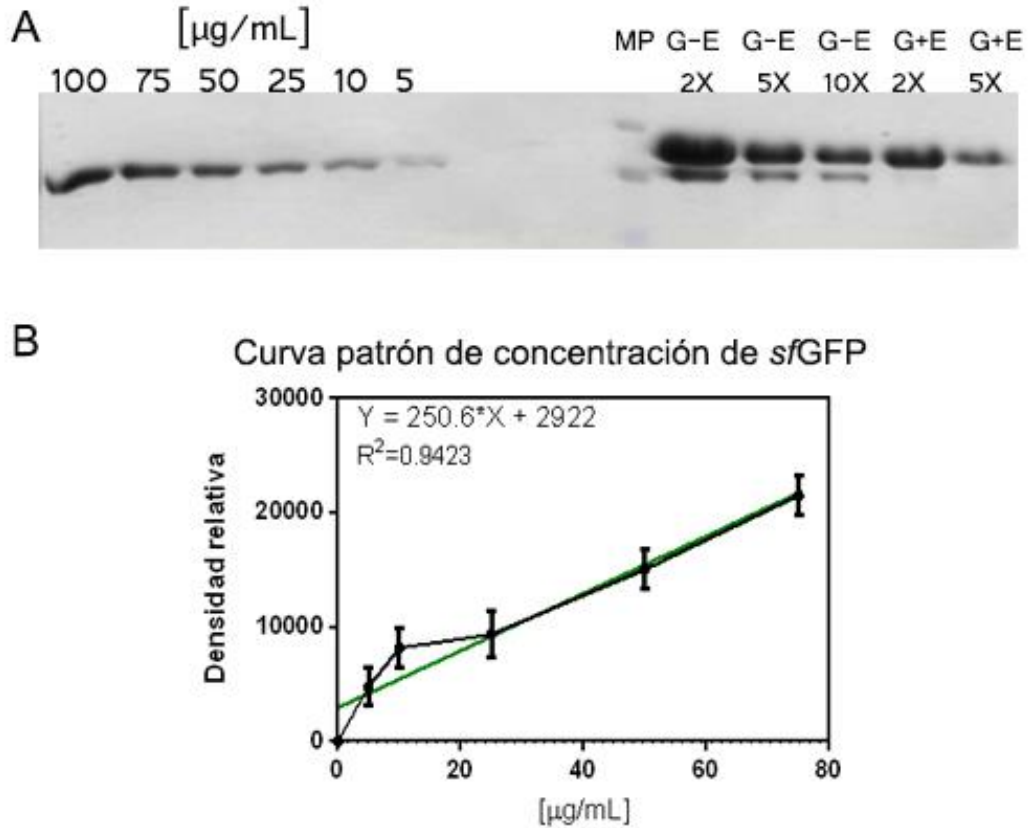


Figura 20. Concentración de sfGFP por densitometría. A) Gel SDS-PAGE, donde de lado izquierdo al marcador de peso molecular (MP) se marcan las diferentes concentraciones de proteína sfGFP. Del lado derecho al marcador de peso (MP) se encuentra las diluciones (X) de los diferentes ensambles cargados en el gel, donde G-E son los ensambles *in vivo* y G+E son los ensambles *in vitro* B) Curva patrón para la concentración de sfGFP generada a partir del gel SDS-PAGE y el análisis de densitometría en el software ImageJ.