



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Caracterización estructural de nanopartículas proteicas viromiméticas mediante
Dispersión de Rayos X de Ángulo Reducido (SAXS) y Microscopía de Fuerza
Atómica (AFM)

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. Natalia Fernanda Rosas Ortiz

Dr. Armando Hernández García

Instituto de Química, UNAM

Ciudad Universitaria, noviembre, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Caracterización estructural de nanopartículas proteicas viromiméticas mediante
Dispersión de Rayos X de Ángulo Reducido (SAXS) y Microscopía de Fuerza
Atómica (AFM)

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. Natalia Fernanda Rosas Ortiz

Dr. Armando Hernández García

Instituto de Química, UNAM



Ciudad de México, noviembre, 2023

Jurado

Presidente	Dr. Miguel Antonio Costas Basín	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Adela Rodríguez Romero	Instituto de Química, UNAM
Vocal	Dr. Enrique García Hernández	Instituto de Química, UNAM
Vocal	Dra. Alejandra Hernández Santoyo	Instituto de Química, UNAM
Secretario	Dr. Ismael Bustos Jaimes	Facultad de Medicina, UNAM

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorio de Ingeniería Biomolecular y Bionanotecnología, Departamento de Química de Biomacromoléculas, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor:

Dr. Armando Hernández García

Sustentante:

Q. Natalia Fernanda Rosas Ortiz

Agradecimientos

Se agradece a CONACyT por la beca otorgada durante los semestres 2020–1 al 2022–2, con el CVU 1086751 y por el financiamiento correspondiente al proyecto de Frontera de la Ciencia 160671. Agradezco al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, así como al Dr. Armando Hernández por la confianza y guía en la realización de este proyecto. También agradezco al Dr. Stefano Da Vela y a la Dra. Melissa Graewert por su apoyo en la gestión experimental en las instalaciones del EMBL en Hamburgo, Alemania y en el manejo de resultados. Así mismo reconozco a laboratorios compañeros del Instituto de Química por su accesibilidad al proporcionar materiales y equipos para el desarrollo de este, en particular, a la Q. María de la Paz Orta Pérez por permitir el uso adecuado de la instrumentación necesaria.

	Página
(a) Resumen.....	6
(b) Justificación	6
(c) Hipótesis.....	6
(d) Objetivo general	6
(e) Objetivos particulares.....	6
(f) Introducción	7
(g) Materiales y métodos.....	11
A. Biosíntesis de las proteínas CS _n B, (n = 0, 10)	11
B. Purificación de las proteínas CS _n B, (n = 0, 10)	11
C. Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)	12
D. Caracterización de las proteínas CS _n B, (n = 0, 10).....	12
E. Producción y purificación de dsDNA de 742 pb.....	12
F. Formación de las nanopartículas proteicas viromiméticas	13
1. Relación molar de carga entre proteína y DNA (N/P).....	13
2. Ensayo de cambio en la movilidad electroforética	13
3. Dispersión de rayos X de ángulo reducido	14
4. Microscopía de fuerza atómica	14
(h) Resultados y discusión	14
A. Caracterización de las proteínas.....	14
B. Caracterización de nanopartículas por SAXS	15
1. Efecto del tipo de proteína: CS _n B, (n=0, 10).....	15
2. Efecto de la concentración de proteína.....	16
3. Efecto de la purificación adicional	17
4. Efecto de la adición de DNA a las proteínas.....	19
5. Efecto de un sistema multicomponente entre proteínas CS ₁₀ B y CB con DNA.	21
6. EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)	24
7. AFM	25
(j) Perspectivas.....	29
(k) Referencias	30
(l) Apéndices	31
A. Preparación de muestras de SAXS.....	31
B. SDS-PAGE de las fracciones colectadas de SEC.....	33

(a) Resumen

Se estudió las propiedades de partículas viromiméticas formadas con proteínas *de novo* mediante SAXS. Se evaluó la influencia de los pasos de purificación, la concentración, la presencia de DNA y el tipo de proteína, en la formación de las partículas viromiméticas; así como un posible efecto de selectividad del DNA al tener un sistema tricomponente.

Se observó mayor dispersión al incrementar la concentración de proteína y que los pasos de purificación no fueron determinantes en los parámetros obtenidos de las partículas con y sin DNA. Además, la forma de las partículas es rodillo alargado, compacto y parcialmente flexible para la proteína CSB. Mientras que, para la proteína CB hay un comportamiento más desordenado, menos compacto y mayormente flexible.

En el sistema tricomponente, se observó que los parámetros R_g , D_{max} y V_p disminuyen conforme se igualan los porcentajes de CSB y CB. Las formas de las estructuras cambian a rodillos conforme se aumenta el porcentaje de CSB. En AFM, se mostró que las estructuras son más rectas y cortas conforme aumenta el porcentaje de CSB. Además, existe una superposición de fibras formando redes.

(b) Justificación

Aunque las proteínas de novo tipo virus C_mS_nB se han estudiado por diversas técnicas, la información que SAXS ofrece abre una nueva oportunidad de caracterizar con mayor detalle su comportamiento en solución, así como los cambios morfológicos, conformacionales y estructurales de las partículas viromiméticas formadas por las proteínas C_mS_nB solas y complejadas con DNA. Esto permitirá ampliar la comprensión sobre su formación, y así, mejorar su diseño y su potencial aplicación.

(c) Hipótesis

- Las características de las partículas formadas en solución son influenciadas por la concentración y composición de la muestra.
- En un sistema compuesto por CB y CSB, con DNA, éste tendrá una afinidad mayor por una de las proteínas.

(d) Objetivo general

Dilucidar las características estructurales de partículas viromiméticas conformadas por CB - DNA y CSB con DNA, y así, ampliar el conocimiento sobre el mecanismo de autoensamble de las proteínas CSB con ADN para el mejoramiento del diseño y su potencial aplicación.

(e) Objetivos particulares

- Producir las proteínas recombinantes CB y CSB en *Pichia pastoris*.
- Purificar las proteínas CB y CSB mediante SEC.
- Estudiar los cambios morfológicos y estructurales de proteínas al interactuar con DNA por SAXS.
- Evaluar el del sistema tricomponente CB / CSB / DNA mediante SAXS, EMSA y AFM.

(f) Introducción

Tomando a la naturaleza como inspiración, se han desarrollado proteínas capaces de encapsular material genético tal como lo hacen los virus, pero sin el riesgo asociado a estos. Estas proteínas, que no se encuentran naturalmente, se diseñaron *de novo* y constituyen un gran avance principalmente en biotecnología y nanomedicina, ya que tienen varias aplicaciones en terapia génica, entrega de fármacos, diagnóstico o incluso inmunoterapia.¹ Debido a esto, es importante entender del proceso de formación mediante autoensamble y los detalles estructurales de ellas, ya que nos conduce a mejorar su diseño y dirigir su función.

Por autoensamble molecular entendemos la *formación espontánea de nanopartículas ordenadas de (macro)moléculas (o bloques de construcción) mediante interacciones no covalentes entre ellas.*² Como las interacciones dipolo – dipolo, fuerzas de Van der Waals, enlace de hidrógeno, interacciones π , etc. La composición del bloque de construcción determinará, en gran medida, el tipo de nanopartícula que se generará. En este proyecto, se emplean las proteínas *de novo* tipo virus C_mS_nB , constituida por 3 bloques:

C: consiste en aproximadamente 100 aminoácidos hidrofílicos, mayormente P, sin capacidad de autoensamble, sin una estructura secundaria y que da estabilidad coloidal;

S: octapéptido con secuencia $(GAGAGAGQ)_n$ de tipo seda con estructura de hoja β que brinda interacción entre proteínas y cooperatividad en el ensamble de partículas de tipo rodillo;

B: secuencia de 12 lisinas (K_{12}) que neutraliza la carga de los grupos fosfato del DNA, lo que permite el anclaje de la proteína al material genético.³

Primero se diseñó la proteína dibloque C_4B , (Figura 1a), con 4 repeticiones de la secuencia C. Hernández-García, A; et al, (2012).³ Posteriormente, con base en el diseño funcional del Virus del Mosaico del Tabaco⁴ (TMV por el inglés *Tobacco Mosaic Virus*), se añadió el bloque S, generando las proteínas C_4S_nB . Siendo la proteína tribloque $C_4S_{10}B$ cuando hay 10 repeticiones del octapéptido (Figura 1b). Hernández-García, A. et al (2014).⁴

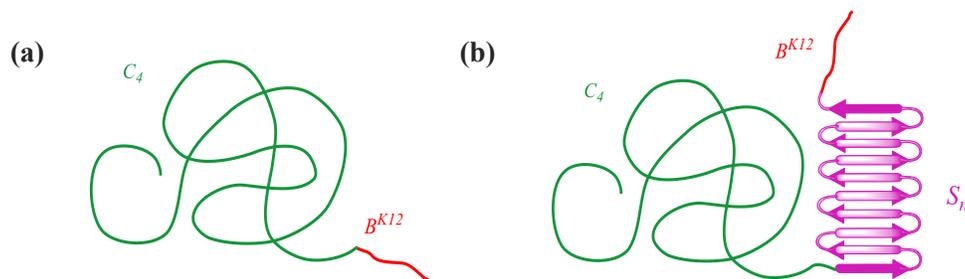


Figura 1. Modelos del (a) polímero dibloque C_4B ; y del (b) polímero tribloque $C_4S_{10}B$.
Adaptado de referencia 4, Hernández-García, A. et al. (2014)

Estas proteínas han sido estudiadas anteriormente mediante técnicas como dispersión dinámica de luz (DLS del inglés Dynamic Light Scattering), microscopía de fuerza atómica (AFM del inglés Atomic

Force Microscopy), ensayos de movilidad electroforética (EMSA del inglés Electrophoretic Mobility Shift Assay)^{3,5}, entre otras. Gracias a esto, se sabe que la proteína dibloque CB, al no poseer bloque de cooperatividad (interacción entre proteínas), permanece mayormente como monómeros polipeptídicos con estructura aleatoria. En presencia de DNA la proteína se une a él y lo recubre, pero no lo condensa ni empaqueta (Figura 2a). En cambio, la proteína tribloque, CSB, forma nanoestructuras de tipo rodillo con 3 nm de altura y hasta 80 nm de longitud y cuando se añade DNA al medio se autoensambla en rodillos con una longitud aproximada de 1/3 de la longitud de contorno inicial del DNA (Figura 2b).

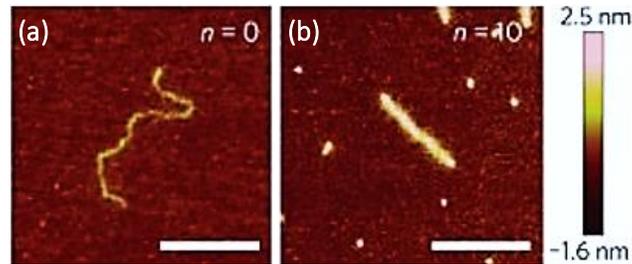


Figura 2. Microscopías de fuerza atómica de dsDNA de 2,5 kbp recubierto con (a)CB y (b)CS₁₀B. Escala: 300 nm. Tomado de referencia 4, Hernandez-Garcia, A. et al. (2014)

Gran parte de lo que conocemos sobre las biomacromoléculas se ha obtenido mediante técnicas con requerimientos de análisis que distan de ser “naturales”. Por ejemplo, una proteína en condiciones fisiológicas, e incluso en amortiguador acuoso, presenta flexibilidad, lo que le permite desempeñar sus funciones al interactuar con otras especies del medio. Sin embargo, al estudiarla mediante técnicas de alta resolución como cristalografía de rayos X (XRC del inglés *X-Ray Crystallography*), criomicroscopía electrónica (Cryo-EM del inglés *Cryogenic Electron Microscopy*) tienen movilidad limitada. Sin embargo, aunque la resonancia magnética nuclear (NMR del inglés, *Nuclear Magnetic Resonance*) no requiere de un cristal y puede hacerse en solución, esta brinda información sobre las interacciones entre núcleos en una misma molécula. Por ello, se emplea la dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS del inglés *Small Angle X-ray Scattering*) que permite estudiar partículas en solución y obtener modelos hasta con resolución de 1-2 nm.

En un experimento típico de SAXS un haz monocromático incide sobre la muestra, los fotones dispersados en cierto ángulo (menor a 10°), se colectan en un detector 2D y son promediados para obtener la curva de dispersión (Figura 3a). Después de sustraer las contribuciones del disolvente o amortiguador y el contenedor, se obtiene la información de las partículas de interés (Figura 3b).

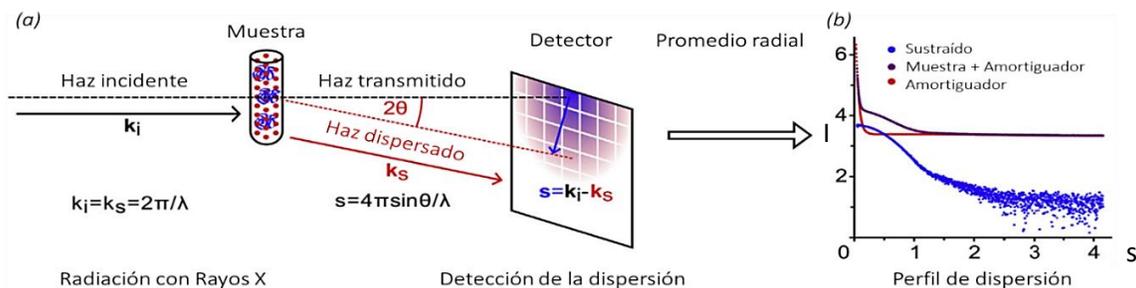


Figura 3. (a) Representación de un experimento SAXS; (b) sustracción de la dispersión de la muestra. Modificado de Gräwert & Svergun (2020).

La técnica de SAXS proporciona una descripción de la estructura global de las partículas en estudio. Para ello se utilizan programas especializados, como ATSAS¹⁴ el cual fue desarrollado en el Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL del inglés *European Molecular Biology Laboratory*). Este software utiliza la información que se obtiene de la muestra y realiza diversos análisis, comenzando por la sustracción de la dispersión de la matriz para obtener los datos correspondientes a la especie de interés (Figura 4). Para esto es necesario conocer la dispersión de la matriz (solvente y amortiguador) y del recipiente de la muestra, de forma individual para obtener la dispersión de las partículas de interés, es decir, la escala absoluta, en la cual la intensidad de dispersión (I) es función del vector de dispersión, s .

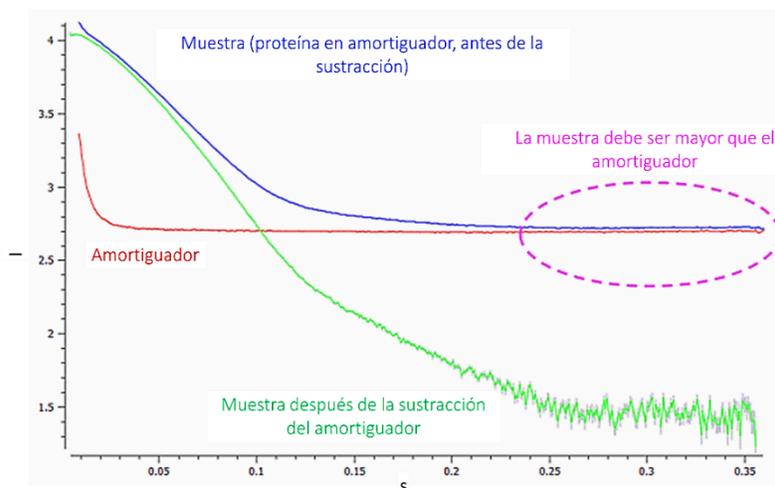


Figura 4. Obtención de la dispersión de las partículas en estudio. Adaptado de referencia 15, *Small Angle X-ray Scattering/Diffraction*, (2023).

Por ejemplo, se han identificado correlaciones entre las estructuras estudiadas con la forma de los gráficos generados con los resultados¹². En particular, la gráfica semilogarítmica donde se muestra el logaritmo de la intensidad de dispersión en función de s , describen la forma de la partícula y la polidispersidad del sistema (Figura 5).

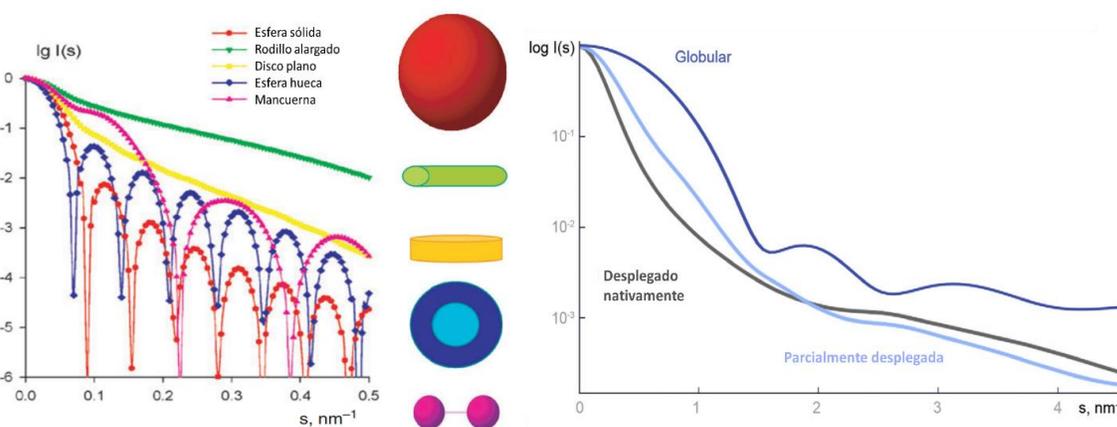


Figura 5. Ejemplos del gráfico de escala logarítmica y su relación con la forma de la partícula. Adaptado de referencia 12, Svergun, D. I. y Koch, M. H. J., (2003) y referencia 9, Kikhney, A.G., Svergun, D.I., (2015).

Mediante el análisis de Guinier, representado en un gráfico donde el $\log I$ es función del cuadrado del vector de dispersión (s^2), puede conocerse el radio de giro (R_g) y el peso molecular mediante $I(0)$, el valor de la intensidad extrapolada a un ángulo de dispersión de cero ($\theta = 0$). Además, el

comportamiento de la gráfica a valores bajos de s^2 describe la interacción entre las partículas de interés. Es decir, si la gráfica tiene una tendencia ascendente es indicativo de agregación, daño por radiación y/o alta polidispersidad en la muestra (Figura 6a), mientras que si la tendencia es descendente corresponde a un sistema con repulsión intermolecular (Figura 6b). Por otra parte, si el comportamiento es lineal, no hay agregación (Figura 6c).

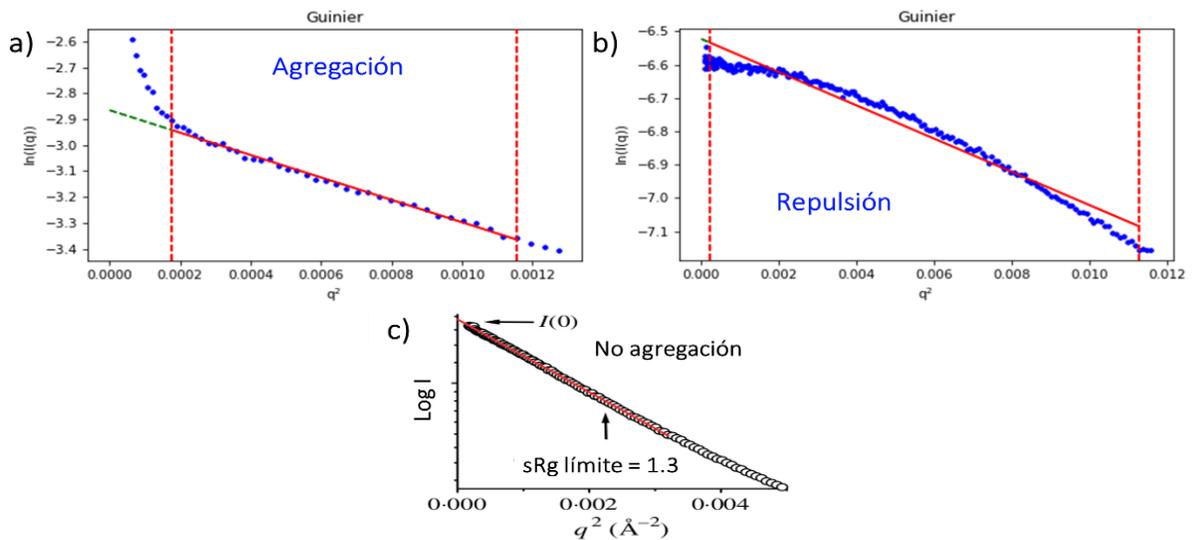


Figura 6. Ejemplos de gráficas de Guinier en sistemas donde predomina la a) agregación, b) repulsión y donde c) no hay agregación. Adaptado de referencia 16, Putnam CD, et al. (2007).

El análisis de Kratky describe la compactabilidad de la partícula en estudio, así como su flexibilidad y si se trata de una proteína multidominio. Se presenta como una gráfica en la que $I(s) \cdot s^2$ es función de s (Figura 7). En el caso de una proteína globular, se tendrá una campana a s bajo y disminuirá a lo largo del eje s , al contrario de las proteínas desplegadas. Si se trata de proteínas con múltiples dominios puede haber picos adicionales a s bajo, disminuyendo a s alto. Es importante ver que la posición del máximo en las curvas a diferentes concentraciones sea la misma, pues puede haber alteraciones debidas a la agregación, la oligomerización o la disociación, dependientes de la concentración lo que podría modificar la conformación de la muestra dominante en determinadas condiciones.

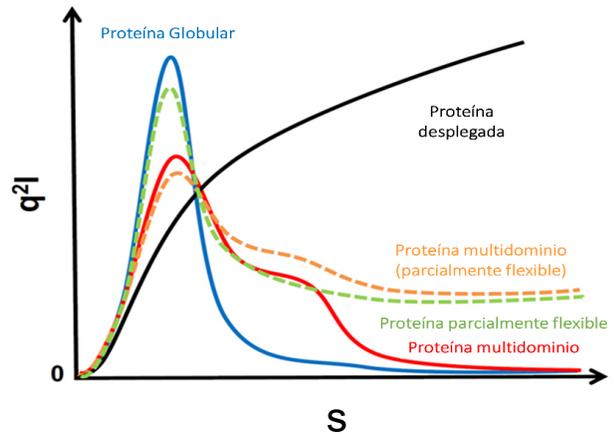


Figura 7. Comportamientos en el gráfico de Kratky. Adaptado de referencia 15, Small Angle X-ray Scattering/Diffraction, (2023).

Otro de los análisis más útiles en SAXS es la distribución de distancia internuclear $\rho(r)$, la cual se obtiene mediante una transformada de Fourier de la curva de dispersión. A través de este cálculo se puede saber la forma de la partícula y si tiene más de un dominio flexible, lo cual puede apreciarse

en la presencia de picos adicionales conforme aumenta la longitud en la molécula (r), pues los cambios en la posición relativa de un dominio, cambia la distribución de masa de la proteína alrededor de su centro de gravedad. También es posible determinar la distancia máxima de la partícula en solución, D_{max} (Figura 8).

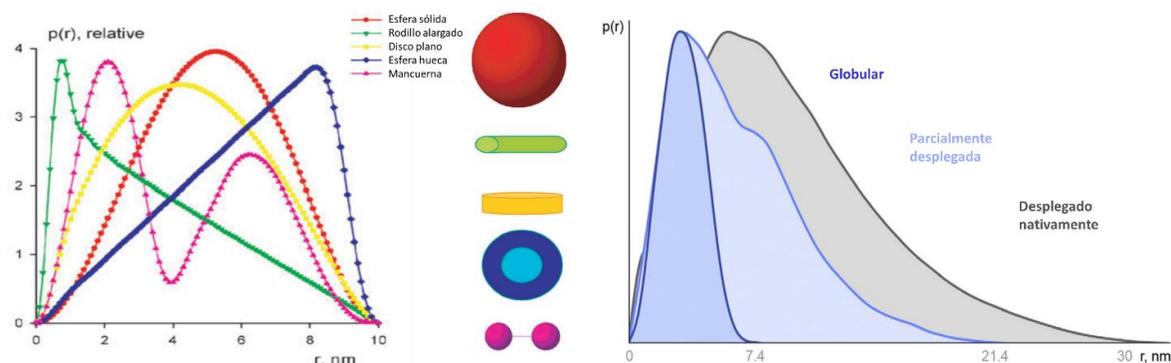


Figura 8. Función de distribución de distancia internuclear ($p(r)$) y su relación con la forma de la partícula. Adaptado de referencia 12, Svergun, D. I. y Koch, M. H. J., (2003) y referencia 9 Kikhney, A.G., Svergun, D.I., (2015).

SAXS constituye una técnica muy útil hasta ahora, sin embargo, su principal desventaja es que los resultados de las muestras con diversos estados oligoméricos o con tendencia a una agregación rápida pueden ser difíciles de interpretar, pues el patrón de difracción muestra un promedio de las contribuciones de cada uno de los estados existentes. Esto último hace difícil atribuir un perfil de dispersión a una conformación específica o una especie macromolecular en particular.

(g) Materiales y métodos

A. Biosíntesis de las proteínas CS_nB , ($n = 0, 10$)

Se siguió el protocolo descrito en Hernandez-Garcia A., et al, 2014.⁴ Se inoculó 1 mL de la cepa recombinante GS115 de *Pichia pastoris* (con el gen codificante para la proteína de interés) en 150 mL de medio MGY (Minimal Glicerol Yeast) y se incubó a 28 °C a 200 rpm (revoluciones por minuto). Al alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) igual a 6 comenzó la fase de adaptación; para ello, el inóculo se centrifugó a 4,500 rpm por 10 min a temperatura ambiente y el pellet se resuspendió en 600 mL de MI (Medio Intermedio) y se mantuvo a 28 °C a 200 rpm con adiciones de 3 mL de metanol (Merck) cada 12 h, pues en este paso se inicia el cambio de la fuente de carbono para la levadura (de glicerol a metanol, 1:5) teniendo un 0.5% v/v de metanol en el medio. Después de 24 h, inició la fase de inducción, en la que las adiciones de metanol aumentaron a 6 mL cada 12 h hasta completar 72 h, teniendo 1% v/v de metanol en el medio.

B. Purificación de las proteínas CS_nB , ($n = 0, 10$)

Las proteínas son secretadas al medio, por lo que el cultivo se centrifugó a 10,000 rpm a 4 °C durante 20 min y se recuperó el sobrenadante (SN). De acuerdo con el volumen recuperado, se añadió EDTA (Promega) 500 mM hasta obtener una concentración final de 10 mM y NaOH (J.T. Baker) hasta alcanzar pH 8.0. Después de 10 min, se centrifugó a 10,000 g a 4 °C durante 20 min. Las proteínas se purificaron

mediante precipitación fraccionada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para provocar la agregación de la proteína y separarla del medio. Para ello se filtró el SN con membrana con poros de $0.22 \mu\text{m}$ (Merck) y se añadió $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Sigma Aldrich) a 60% (v/v) para $\text{C}_4\text{S}_{10}\text{B}$ y 50% (v/v) para C_4B , ambas a temperatura ambiente. Después de almacenar durante 72 h a 4°C , la solución se centrifugó a $20,000 \text{ g}$ a 4°C durante 20 min. El pellet se resuspendió en 60 mL de agua desionizada (MQ) a 70°C y se repitió la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Después de resuspender el pellet, se precipitó con acetona (High Purity), con el propósito de separar a la proteína del $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Para ello, el pellet se recuperó en 10 mL de agua mQ a 70°C , se añadió NaCl (Sigma Aldrich) 4 M para tener una concentración final de 0.05 M y acetona para tener 40% (v/v) del volumen total del SN. Se centrifugó a $15,000 \text{ g}$ a 4°C durante 10 min y se recuperó el SN. Se adicionó la acetona necesaria para completar el 80% (v/v) y se homogenizó hasta observar un precipitado. Se centrifugó a $4,500 \text{ rpm}$ a 4°C durante 10 min y se incubó el precipitado a 37°C para evaporar la acetona residual. El pellet se resuspendió en 2 mL de agua MQ y se filtró en una membrana para proteínas de 14 kDa (Merck). Se colocó en 2 L de agua MQ a 4°C , $160 - 180 \text{ rpm}$ con cambios del mismo volumen cada 12 h hasta completar 48 h. El dializado se guarda a -20°C aprox. 12 h para liofilizar a -54°C y 0.04 mbar durante 8- 10 h.

C. Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

Después de purificar por precipitación fraccionada, la proteína se purificó con SEC para obtener un mayor grado de pureza. Para ello se utilizó un FPLC Äkta Pure (Cytiva) con una columna 16/600 Superdex 200 pg (Cytiva) de 120 mL con una fase estacionaria de dextrano y agarosa entrecruzados. Se empleó un amortiguador de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-sulfónico o HEPES (Formedium) 20 mM, pH 7.5 y KCl (Fermont) a 500 mM como fase móvil a un flujo de 0.5 mL/min . En tales condiciones, $\text{C}_4\text{S}_{10}\text{B}$ eluye a 36 mL (72 min) y C_4B a 45 mL (90 min). La fracción colectada constituyó aprox. 30 mL por lo que se concentró en unidades de filtración centrifuga de 10 kDa (Merck). La solución se dializó en membrana con peso molecular de corte de 14 kDa (Merck) con 2 L de agua MQ durante 48 h y con cambios del mismo volumen cada 12 h. La solución dializada de proteína se almacenó a -20°C al menos 12 h para su posterior liofilización a -54°C a 0.04 mbar durante 8 h.

D. Caracterización de las proteínas CS_nB , ($n = 0, 10$)

Las proteínas CS_nB se analizaron mediante Electroforesis en gel de poliacrilamida/dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), posterior a la purificación por SEC. Se preparó la muestra con $30 \mu\text{g}$ de proteína y amortiguador de carga (BioRad)). Se cargó en geles de 7.5 % de acrilamida, la separación ocurrió a 70 V durante 90 min con amortiguador de tanque 1X. En la tinción se utilizó azul de Coomassie (SimplyBlue) siguiendo el protocolo del fabricante. Se empleó la técnica de espectroscopía de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF), en un equipo Microflex, Bruker. Las muestras estaban a una concentración de 1-2 g/L. Se utilizó ácido sinapínico como matriz, en proporción 1:5 (muestra/matriz), se prepararon por el método de secado de gota.

E. Producción y purificación de dsDNA de 742 pb

El DNA se produjo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR en inglés), con el plásmido pAcGFP1-N1 con los cebadores directo: $5' - \text{ATGGTGAGCAAGGGCG} - 3'$ e inverso: $5' -$

/5ATTO590/TTATGATCTAGAGTCGCGGC-3', (IDT, USA), el cual se encuentra modificado en el extremo 5' con el fluoróforo ATTO590. Este plásmido se coloca a 1 ng/ μ L y GoTaq G2 Hot Start Colorless Master Mix, 2X (Promega). La iniciación duró 120 s a 95°C, seguido de la elongación que abarcó 35 repeticiones del ciclo: 35 s a 95°C, 30 s a 50°C y 50 s a 72°C. La terminación ocurrió a 72 °C durante 300 s para finalmente permanecer a 12°C. Posteriormente, el DNA se purificó mediante precipitación con etanol. Para ello se utilizó acetato de sodio 3 M, pH 5.2 y etanol absoluto (High Purity). Tal solución se almacenó a 4°C durante 12 h aproximadamente. Se centrifugó a 14,000 g durante 30 min a 4°C. El pellet se resuspendió en etanol al 70% y se centrifugó en las mismas condiciones durante 15 min. Luego, se descartó el SN y se recuperó el pellet en agua mQ estéril, almacenándolo a -20°C al menos 12 h para su posterior liofilización a -54 °C a 0.04 mbar.

F. Formación de las nanopartículas proteicas viromiméticas

En la preparación de las nanopartículas se partió de soluciones stock de ambas proteínas C₄SQ_nB (n=0, 10) a una concentración de 3 y 3.5 g/L respectivamente, con 1 mM de ditioneitol (DTT, como agente reductor para evitar la formación de puentes disulfuro, debido a la existencia de C (cisteína) al inicio del bloque C₄) para C₄S₁₀B. Las muestras tuvieron un volumen final de 10 μ L con amortiguador HEPES a 25 mM. Estas se homogenizaron mediante vórtex y se calentaron a 70°C durante 10 min. Estos pasos se repitieron al menos 3 veces y, finalmente, se agitaron en el vórtex y se guardaron a temperatura ambiente aproximadamente 12 h. La composición de las muestras incluyó a la proteína y el DNA a las concentraciones adecuadas para los valores de N/P estudiados (ver siguiente sección).

1. Relación molar de carga entre proteína y DNA (N/P)

El parámetro N/P relaciona la cantidad de mol de carga positiva de los grupos NH₃⁺ del bloque B (12 lisinas) con la cantidad de mol de cargas negativas de los grupos PO₄³⁻ del DNA y se define mediante el siguiente cociente que establece la estequiometría de cargas entre la proteína y el DNA:

$$N/P = \frac{n(NH_3)^+}{n(PO_4)^-}$$

Si N/P < 1, no hay suficiente carga positiva de la proteína para neutralizar a todo el DNA presente en la solución, por lo que hay más sitios de unión disponibles en el DNA. Mientras que si N/P = 1, las cargas de la proteína y el DNA se encuentran en cantidades equivalentes, aunque esto no garantiza la unión de estas especies. En cambio, en N/P > 1 hay un exceso de carga proteica respecto a la carga del DNA.

2. Ensayo de cambio en la movilidad electroforética

En estos ensayos se evaluaron N/P de 1 y 3. La separación ocurrió en gel de agarosa al 0.8% a 80 V durante 45 min. Se tiñó con DNA SyberSafe y se registró en un documentador (Azure Biosystems). Los geles se analizaron con el programa ImageJ.

3. Dispersión de rayos X de ángulo reducido

Estos experimentos se realizaron en el sincrotrón del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL, Hamburgo); en la línea P12 con el ondulator Petra III V29 a una longitud de onda de 0.1239 nm (10,000.2 eV). Se propusieron 2 lotes de experimentos cuyo planteamiento se detalla en la sección VI (Apéndice 1). Cada muestra se preparó a N/P de 1 y 3 en 40 μ L con amortiguador HEPES 25 mM a pH 7.5, 2 mM DTT. Los datos se analizaron con el software ATSAS 5.12.6, así como con Origin 2021 y GraphPad PRISM 8.

4. Microscopía de fuerza atómica

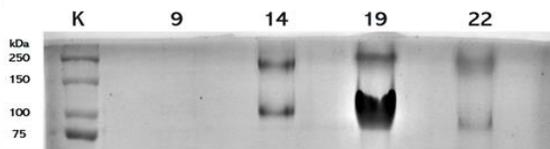
Se evaluó un N/P de 3 con dsDNA de 2,500 pb (Thermo Scientific). Se depositaron 5 μ L de muestra en mica, previamente pelada con un adhesivo, y se incubaron durante 5 min. Posteriormente la superficie de la mica se lavó cuidadosamente con 500 μ L de agua MQ y se secó con aire. Las imágenes fueron obtenidas con Multimode 8HR (Bruker) por medio del modo ScanAsyst™, donde se utilizó un cantiléver de Si₃N₄ (con una constante elástica de 0.32 N*m⁻¹). El procesamiento y análisis de las imágenes se realizó con los softwares NanoScope Analysis 1.80 (Bruker) e ImageJ (medición de las dimensiones de las partículas).

(h) Resultados y discusión

A. Caracterización de las proteínas

El peso molecular teórico de cada proteína es de 38.407 kDa para CB y 44.749 kDa para CSB. Estos valores no coinciden con lo observado por SDS-PAGE (Figura 9) dado que las proteínas contienen un alto porcentaje de aminoácidos hidrofílicos y, por tanto, no interaccionan eficientemente con el SDS. El espectro de masas verificó el peso molecular de las proteínas, en donde se observaron valores de 38.422 y 44.786 kDa para C₄B y CS₁₀B, respectivamente, los cuáles son muy cercanos a los valores teóricos para cada proteína.

(a) CB



(b) CS₁₀B

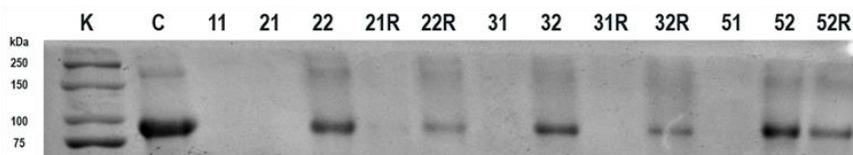


Figura 9. Gel SDS-PAGE para las proteínas CS_nB después del paso de purificación SEC, (a) $n = 0$ y (b) $n = 10$. En ambos casos se comparó contra un control (purificación estándar), denotado con la letra C.

B. Caracterización de nanopartículas por SAXS

Los experimentos planteados tienen como objetivo evaluar el efecto de varios factores en la formación y morfología de las nanopartículas viromiméticas de las proteínas CS₁₀B y CB. Los factores evaluados son: i) tipo de proteína, ii) proceso de purificación usado, iii) concentración de proteína y (iv) adición de DNA.

Como parte de los análisis que realiza el software PRIMUS (ATSAS), se clasificó a los sistemas como “*monodisperso arbitrario*”, esto significa que las partículas parecen ser del mismo tamaño, pero con formas diversas. Asimismo, se indica que las partículas son de tipo globular.

1. Efecto del tipo de proteína: CS_nB, (n=0, 10)

Se evaluaron 2 tipos de proteína, CS₁₀B y CB, a tres diferentes concentraciones (22, 40 y 78 μM) y con 2 tipos de pasos de purificación (con y sin SEC) con el propósito de determinar las diferencias en los agregados que forman. En la Figura 10a, se muestra que la proteína tribloque CS₁₀B presenta la misma forma de la curva en todas las concentraciones evaluadas. Asimismo, las curvas de ambas proteínas muestran mayor intensidad a altas concentraciones, lo que corresponde con mayor dispersión debido a una mayor cantidad de partículas y/o partículas de mayor tamaño. Ahora bien, comparando la pendiente de las gráficas presentadas en la Figura 10, se observa que para CS₁₀B son ligeramente más pronunciadas que para CB, sin importar el nivel de concentración o los pasos de purificación empleados. Una pendiente más pronunciada indica que las partículas (en este caso las del tribloque) son más compactas (que las del dibloque). Además, la forma de la gráfica, según lo señalado por Svergun, D. I. y Koch, M. H. J., 2003 (Figura 5a), indica que las partículas formadas por el tribloque corresponden a rodillos alargados. Por otra parte, las pendientes menos pronunciadas de las curvas de dibloque (Figura 10b, círculo azul), es propio de proteínas desestructuradas o que tienen una conformación aleatoria⁹. Así mismo, los cambios de pendiente observados para CB a valores bajos de *s* (zona indicada con una flecha amarilla), indican posible repulsión intermolecular entre las proteínas CB que al no tener bloque S no forman agregados regulares.

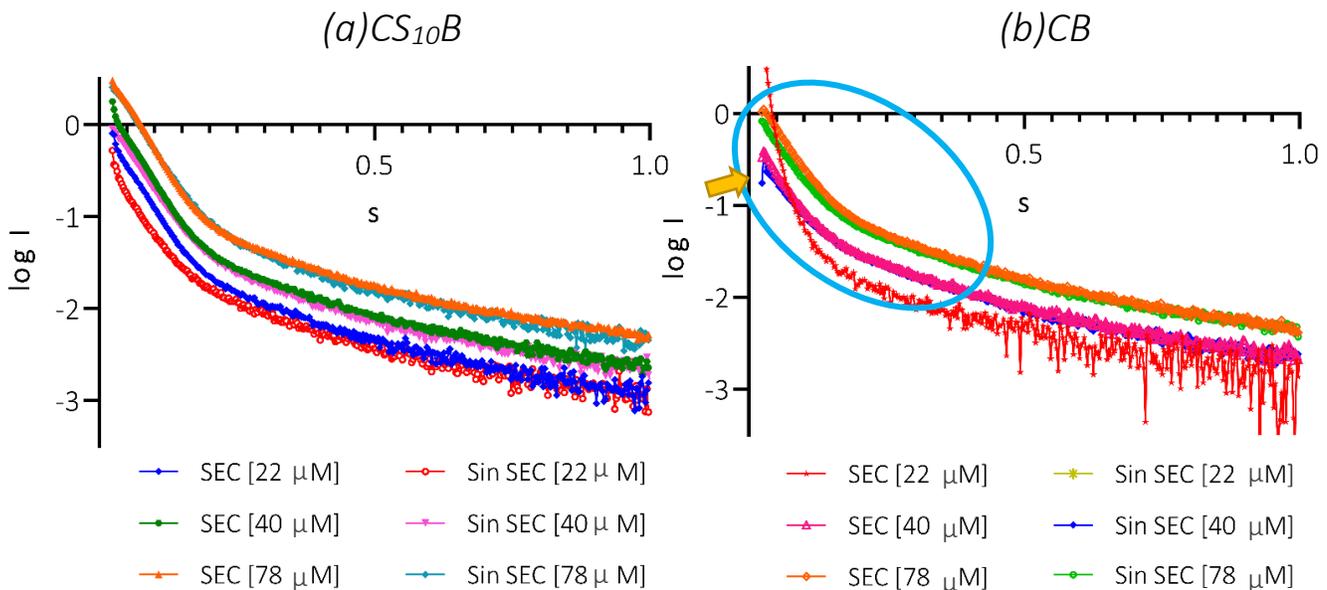


Figura 10. Escala logarítmica ($\log I$ vs s) de las proteínas (a) CS₁₀B y (b) CB en todos los niveles de concentración (22, 40 y 78 μM) con y sin SEC adicional.

En el gráfico de Kratky (Figura 11, a y b), se aprecia para ambas proteínas que conforme aumenta la concentración de proteína se define mejor un valor máximo, aunque las curvas de CSB (Figura 11a) tienen máximos más pronunciados y definidos que para CB (Figura 11b). Lo anterior indica que las partículas de tribloque CSB son más compactas y menos flexibles que aquellas formadas por el dibloque CB. Mediante el análisis de Guinier (Figura 11 (c y d)), sabemos que la interacción dominante en la proteína tribloque es agregación, pues se marca una tendencia ascendente, es decir, muestra un aumento en el $\log I$ al disminuir el valor de s^2 (indicada con un círculo en Figura 10c). Mientras que para el dibloque se observan picos en el mismo intervalo (Figura 10d), indicando posible repulsión intermolecular. Las tendencias descritas en ambas proteínas se cumplen en todos los niveles de concentración y pasos de purificación evaluados, sin embargo, más adelante se discutirán cada uno de manera detallada.

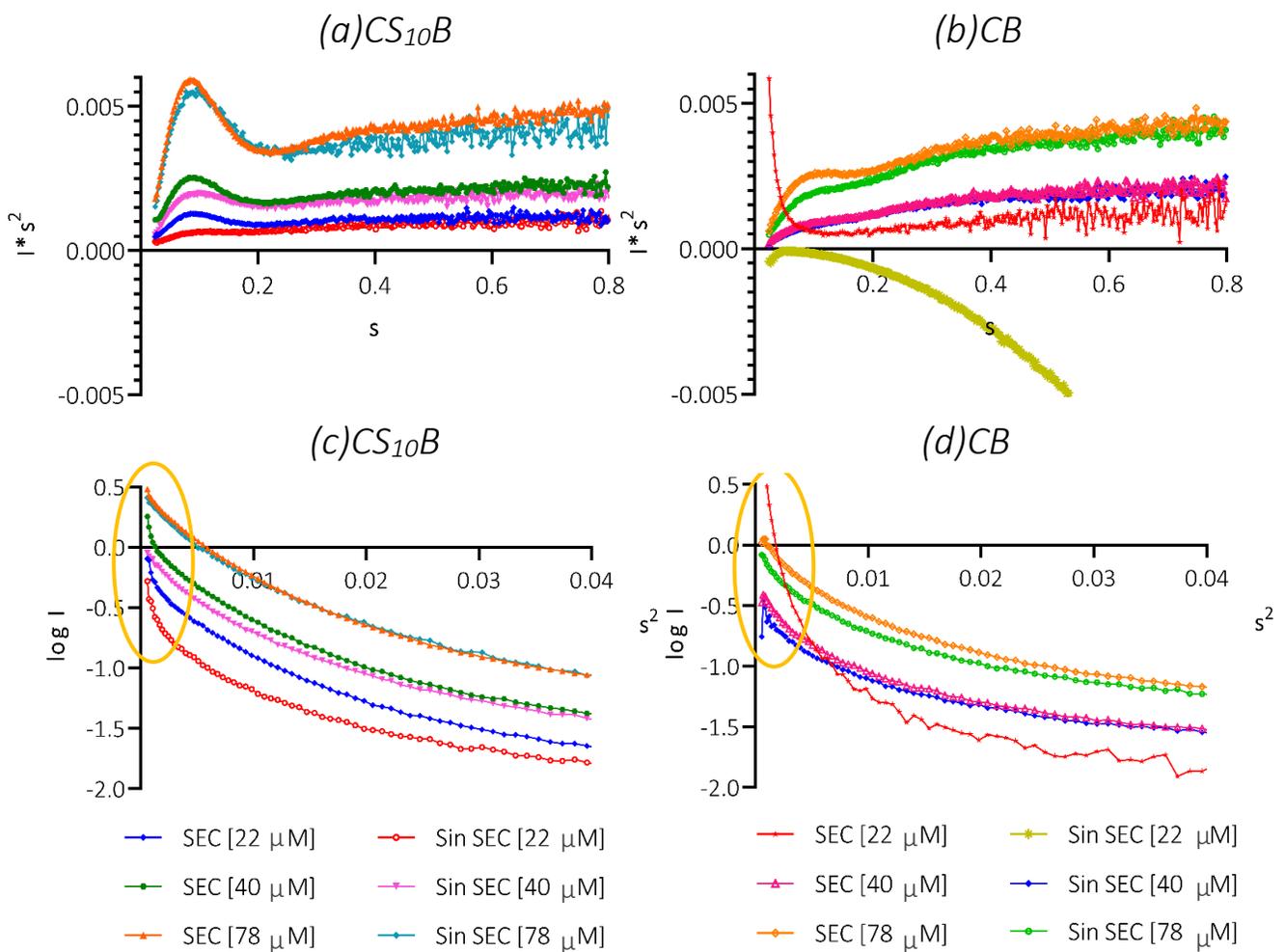


Figura 11. Gráficos de Kratky ($I \cdot s^2$ vs s) de las proteínas (a) CS₁₀B y (b) CB; y gráficos de Guinier ($\log I$ vs s^2) para (c) CS₁₀B y (d) CB, en todos los niveles de concentración (22, 40 y 78 μ M) con y sin SEC adicional.

2. Efecto de la concentración de proteína

La finalidad de estos experimentos es estudiar las características de los agregados formados al variar la concentración de la proteína en la solución. Se prepararon muestras de CS₁₀B y CB a tres

concentraciones distintas: 22 μM (nivel bajo), 40 μM (nivel intermedio) y 78 μM (nivel alto). Además, se prepararon muestras purificadas con y sin SEC.

En los gráficos de intensidad de dispersión en escala absoluta (I vs s) (Figura 12) para ambas proteínas, con y sin SEC adicional, se observa que la intensidad aumenta conforme aumenta la concentración, debido al aumento de partículas en el medio, así como un incremento en el tamaño de las partículas formadas. El tribloque mostró un comportamiento coherente en todas sus concentraciones (Figura 12a), mientras que el dibloque (Figura 12b) presenta anomalías en las curvas de la concentración más baja (22 μM), por lo que fueron descartadas para análisis posteriores.

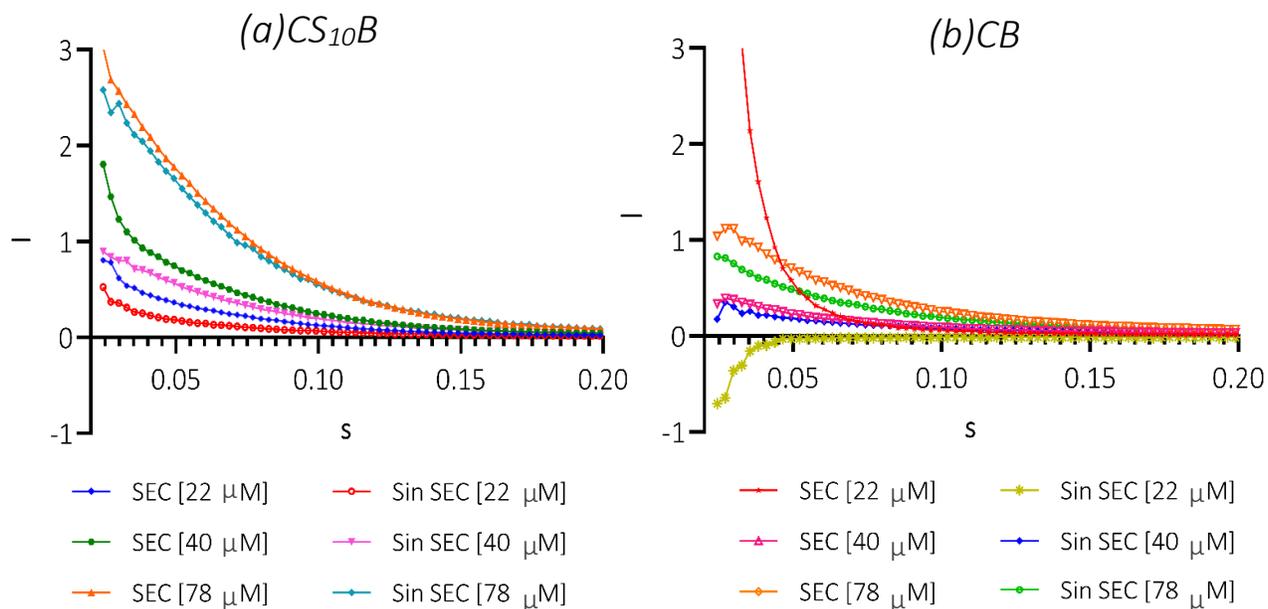


Figura 12. Escalas absolutas de (a) $CS_{10}B$ y (b) CB a todas las concentraciones y pasos de purificación estudiados, sin DNA

Debido a que la concentración más elevada de $CS_{10}B$ (78 μM), es cercana a la concentración crítica de agregación reportada (80 μM)⁴, se asume una contribución importante al aumento de la intensidad de dispersión de parte de la existencia de un autoensamble o agregados tipo rodillo de proteína. Por el contrario, en medios muy diluidos la señal de dispersión puede presentar anomalías, como en el caso de CB a 22 μM , pues no hay suficientes partículas o son muy pequeñas para generar una señal detectable. Por esto se estableció un intervalo de concentración en el que se obtuviera una señal suficiente, así considerando que en el nivel de concentración bajo se apreciaron anomalías explicables mediante la dilución de la muestra, en adelante se mostrarán los resultados de las concentraciones intermedias y altas.

3. Efecto de la purificación adicional

SAXS requiere un mínimo de interferencias para dar una mejor descripción de las partículas analizadas, por lo que las proteínas CS_nB fueron adicionalmente purificadas mediante SEC, además del procedimiento convencional de purificación mediante precipitación fraccionada, esto con el fin

de determinar si el grado de pureza de las muestras tiene un efecto importante en la formación de las nanopartículas.

Al comparar ambas proteínas con y sin SEC (Figura 12), se observa que las muestras con SEC dispersan con mayor intensidad que aquellas sin SEC, aunque con un comportamiento similar entre ellas. Quizás la razón de esto es que al adicionar el paso de purificación extra con SEC se remueven impurezas y/o agregados recalcitrantes de proteínas que afectan el ensamble o la agregación adecuada de las demás proteínas. Esto deriva en una mejor interacción entre proteínas por una disminución de contaminantes debido a la purificación por SEC, favoreciendo la agregación en forma de nanorodillos por parte de CS₁₀B y en agregados por parte de CB, y esto podría contribuir a una mayor dispersión de intensidad de señal de SAXS. El comportamiento de las proteínas con SEC adicional se atribuye a una mayor pureza de la muestra que mejora la interacción entre moléculas; ya que la proteína tribloque genera partículas más compactas que las del dibloque. Sin embargo, el ligero incremento en la dispersión de las muestras con SEC no es suficiente para afirmar que entre más pasos de purificación se mejore la interacción entre proteínas.

Para la proteína CS₁₀B con SEC, los parámetros R_g y D_{max} determinados disminuyen ligeramente conforme aumenta la concentración (Tabla 1). En cambio, se muestra una tendencia contraria en la misma proteína sin SEC. En este caso de CSB con SEC, al tener menor cantidad de impurezas, los monómeros interactúan adecuadamente formando partículas ligeramente más compactas. Además, al implementar SEC se remueven los agregados de proteína previamente formados, que pueden nuclear el ensamble hacia agregados de mayor tamaño, lo cual hace que las partículas formadas en solución no sean de mayor tamaño. Bajo este orden de ideas, las partículas de CS₁₀B sin SEC se hacen más grandes y polidispersas conforme aumenta la concentración, debido a que en las impurezas no removidas por SEC (presentes desde el método de purificación estándar de la proteína, ver Apéndice B) inducen la nucleación de partículas de mayor tamaño.

Tabla 1. Parámetros estructurales de CS₁₀B y CB con y sin SEC.

Concentración	40 μ M (Intermedia)		78 μ M (Alta)	
	R _g [nm]	D _{max} [nm]	R _g [nm]	D _{max} [nm]
CS ₁₀ B con SEC	27.0	98.5	26.6	94.5
CS ₁₀ B sin SEC	26.0	82.5	28.8	111.6
CB con SEC	26.5	86.4	34.6	137.7
CB sin SEC	24.0	76.7	23.7	71.9

Por otra parte, para la proteína CB los parámetros R_g y D_{max} cambian de manera opuesta a CS₁₀B, aumentan con la concentración cuando se purificó con SEC y disminuyen cuando no se usó SEC. Esto indica que la proteína CB interactúa en algún agregado que se forma más eficientemente cuando se remueven impurezas por SEC. Con todo lo anterior, se considera que la interacción intermolecular fue más eficiente en las muestras con SEC debido a una menor cantidad de interferentes, por lo que,

en adelante, los resultados mostrados solo se referirán a las proteínas adicionalmente purificadas con SEC.

4. Efecto de la adición de DNA a las proteínas.

Se estudió el efecto de añadir DNA a las proteínas. Para los experimentos se formaron mezclas de proteína y DNA a una relación molar de carga positiva de proteína/negativa de DNA (N/P) = 1 y 3. En las mezclas siempre se mantuvo constante la concentración de proteína (40 μ M) por lo que solo se varió la concentración de DNA (0.32 y 0.11 μ M para tener N/P = 1 y 3, respectivamente). Las muestras se compararon con soluciones de proteína sin DNA (N/P = 0).

Los parámetros hidrodinámicos (R_g y D_{max}) calculados se muestran en la Tabla 2. Para la proteína CS₁₀B las partículas formadas aumentan de tamaño de acuerdo con el siguiente orden de N/P = 1 < 0 < 3, donde N/P = 0 significa que no hay DNA en el medio. A un N/P = 3 se favorece la neutralización completa del DNA y formación de nanopartículas más grandes debido al exceso de proteína en la solución. Sin embargo, esto no se cumple en el caso de N/P = 1, por ello se propone que en el sistema no solo hay un tipo de partícula (Figura 13), pudiendo haber proteína libre, partículas viromiméticas, y aunque poco probable, DNA libre. Esto se propone puesto que los datos obtenidos son un promedio de todas las entidades presentes en el medio, cuyas contribuciones a la dispersión pueden influir en la determinación de los parámetros de las partículas presentes en la muestra. Por otra parte, el parámetro D_{max} a N/P = 1 y 3 de la proteína CB no pudo determinarse, lo que se asocia al tamaño de las partículas formadas pues se sabe que la proteína CB no compacta el DNA, solo lo recubre. Sin embargo, su R_g disminuye conforme aumenta el N/P pareciendo que CB forma partículas de menor tamaño conforme aumenta el N/P. En este caso, se debe considerar que existen los 3 tipos de partícula anteriormente mencionados y que el CB no tiende a la agregación, lo cual disminuye el radio de partícula conforme aumenta la concentración.

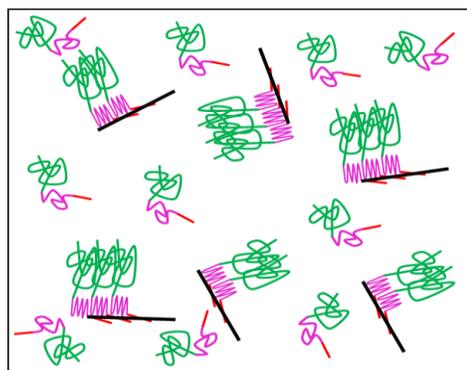


Figura 13. Representación estimada de las partículas presentes en el sistema proteína – DNA. Barra negra: DNA

Tabla 2. Parámetros estructurales de las partículas viromiméticas con CS₁₀B y CB (40 μ M) con DNA a N/P 0,1 y 3.

Proteína	0		1		3	
	R_g [nm]	D_{max} [nm]	R_g [nm]	D_{max} [nm]	R_g [nm]	D_{max} [nm]
CS ₁₀ B	27.0	98.5	26.1	80.56	39.7	147.1
CB	26.5	86.4	15.2	-	13.9	-

Las gráficas de log I vs s de las muestras de CS₁₀B se superponen casi totalmente, sobre todo a valores de s entre s 0.25 y 0.4 (Figura 14a), además, se observa que tienen una pendiente indicativa de rodillos alargados (ver Figura 5). Así mismo, las gráficas correspondientes al sistema CB-DNA

muestran picos (Figura 14b), en valores muy bajos de s^2 , lo cual puede indicar repulsión intermolecular, las curvas indican que se trata de discos planos (ver Figura 5). Los gráficos de Kratky (Figura 15) de la proteína CS₁₀B se muestran como campanas lo que indica la presencia de partículas mayormente compactas (estructuradas), además de ser parcialmente flexibles ya que se observa un aumento progresivo a $s > 0.2$ (ver Figura 7). El gráfico correspondiente muestra la tendencia de $N/P = 1 > 3 > 0$, lo cual indica un sistema con partículas más compactas a $N/P = 1$, debido a que mayor cantidad de la proteína está unida al DNA. Mientras que en $N/P = 3$ hay un exceso de proteína respecto al DNA lo que conlleva a que el poco DNA presente está neutralizado y de que haya más proteína libre en solución que a $N/P = 1$. Por otra parte, a $N/P = 0$ solo se trata de agregados de proteína.

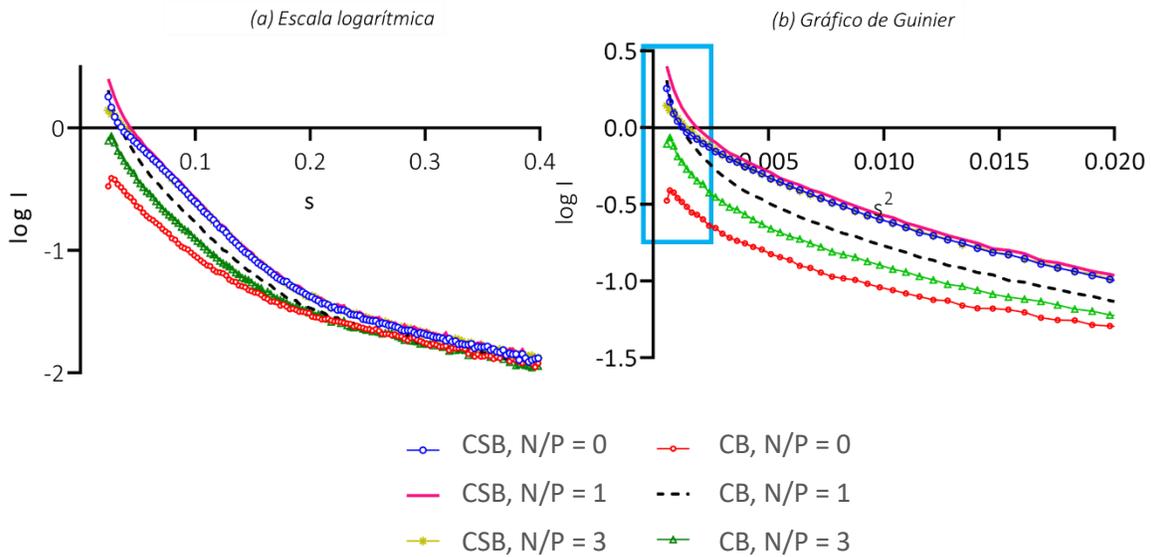


Figura 14. (a) Escala logarítmica y (b) Gráfico de Guinier de las partículas viromiméticas formadas con CS₁₀B y CB a N/P 0, 1 y 3.

En la Figura 15 se muestran los gráficos de Kratky para ambas proteínas, se observa que CB muestra una tendencia similar a CS₁₀B, pero sus campanas no están tan definidas. Además, en las gráficas correspondientes a CB, se muestra que las gráficas tienen diferente amplitud dependiendo del N/P, lo que se atribuye a que CB recubre el DNA sin condensarlo al no contar con un bloque de autoensamble S que organice y estructure a las proteínas, lo que conduce a generar partículas con DNA más flexibles y extendidas que CS₁₀B. A $N/P = 0$, CB tiene una curva indicativa de una proteína completamente desplegada o desestructurada (ver Figura 7). Las partículas formadas a $N/P = 1$ parecen ser las más compactas que las formadas en $N/P = 0$

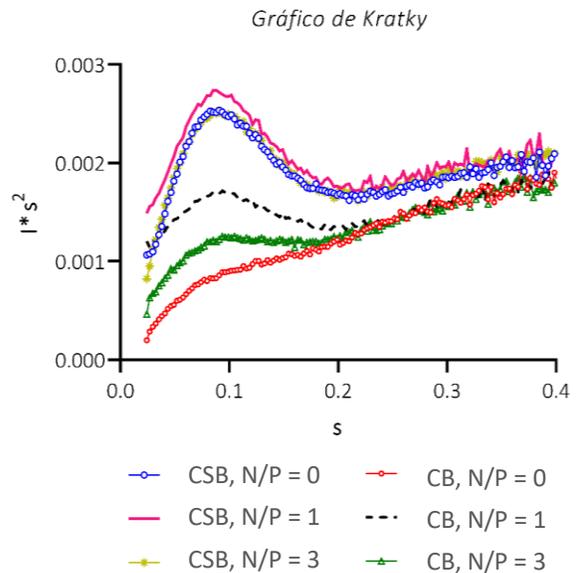


Figura 15. Gráfico de Kratky de las partículas viromiméticas con CS₁₀B y CB a N/P 0, 1 y 3 (78 μ M).

o 3, aunque a todos los valores de N/P se observa una flexibilidad similar con base en el comportamiento mostrado en $s > 0.2$.

5. Efecto de un sistema multicomponente entre proteínas CS₁₀B y CB con DNA.

Conociendo el comportamiento de las proteínas CS₁₀B con y sin DNA por separado, se estudió la formación de partículas viromiméticas en un sistema heterogéneo compuesto por las proteínas CS₁₀B, CB y DNA. Para ello, se prepararon muestras con una cantidad de proteína total constante (78 μM), pero en proporciones variables de las proteínas CS₁₀B, CB y a dos valores de N/P, 1 (7.5 μM de DNA) y 3 (2.5 μM de DNA). El propósito de estos experimentos es evaluar si hay una preferencia de alguna de las proteínas al DNA, además de determinar las características de las partículas formadas en los sistemas de estudio en solución.

a) Tamaño

En la gráfica de escala absoluta (Figura 16a) para N/P = 1 se observa que los porcentajes 40, 50 y 60% de CS₁₀B (60, 50 y 40% de CB, respectivamente) se traslapan y generan la mayor intensidad. En la Figura 16b se muestran las curvas para N/P = 3 y se observa que se agrupan más que en N/P = 1, excepto para 100 y 0% de CS₁₀B. Incluso 0% de CS₁₀B (equivalente a 100% de CB) permanece distante del resto de los porcentajes, cuya caída es más pronunciada.

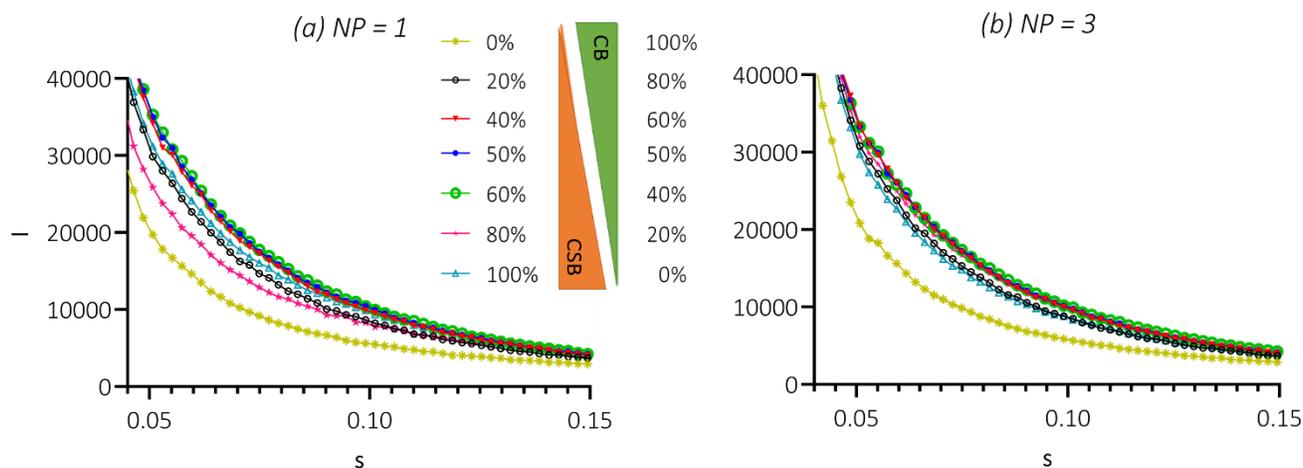


Figura 16. Escala absoluta de las partículas viromiméticas formadas en el sistema multicomponente a (a) N/P = 1 y (b) N/P=3.

Con lo anterior, podría decirse que las muestras con porcentajes intermedios de proteína tribloque tienen un comportamiento similar entre ellas y distinto a cuando hay una de las dos proteínas principalmente. De lo anterior, se considera que la presencia de la proteína CS₁₀B en el medio tiene mayor influencia en la formación de las nanopartículas debido al bloque S de cooperatividad, pues desde el primer porcentaje de CS₁₀B evaluado (20%), se observa un cambio importante a comparación del %0 de CS₁₀B.

Se observa que las intensidades y radios de giro a N/P = 1 son mayores que a 3 en la mayoría de los porcentajes evaluados (Figura 17 a-b). Esto indica que en promedio el ensamble de partículas a

N/P = 1 son más grandes que a N/P = 3. También se nota que a porcentajes intermedios de CS₁₀B (notablemente a 60%) se alcanzan valores máximos de intensidad y radio de giro para N/P = 1 y mínimos para N/P = 3. Por otra parte, el radio de giro es menor en N/P = 3 en comparación con N/P = 1, excepto en los porcentajes extremos (Figura 17b). Por otro lado, las tendencias para D_{max} y volumen hidrodinámico (Figura 17c y 17d) son similares en tanto que muestran valores mínimos para, generalmente, porcentajes intermedios de CS₁₀B y ambos N/P 1 y 3, pues se observa que las partículas formadas con 40 - 60 % de CS₁₀B tiene un D_{max} y volumen más pequeño que en el resto de los porcentajes.

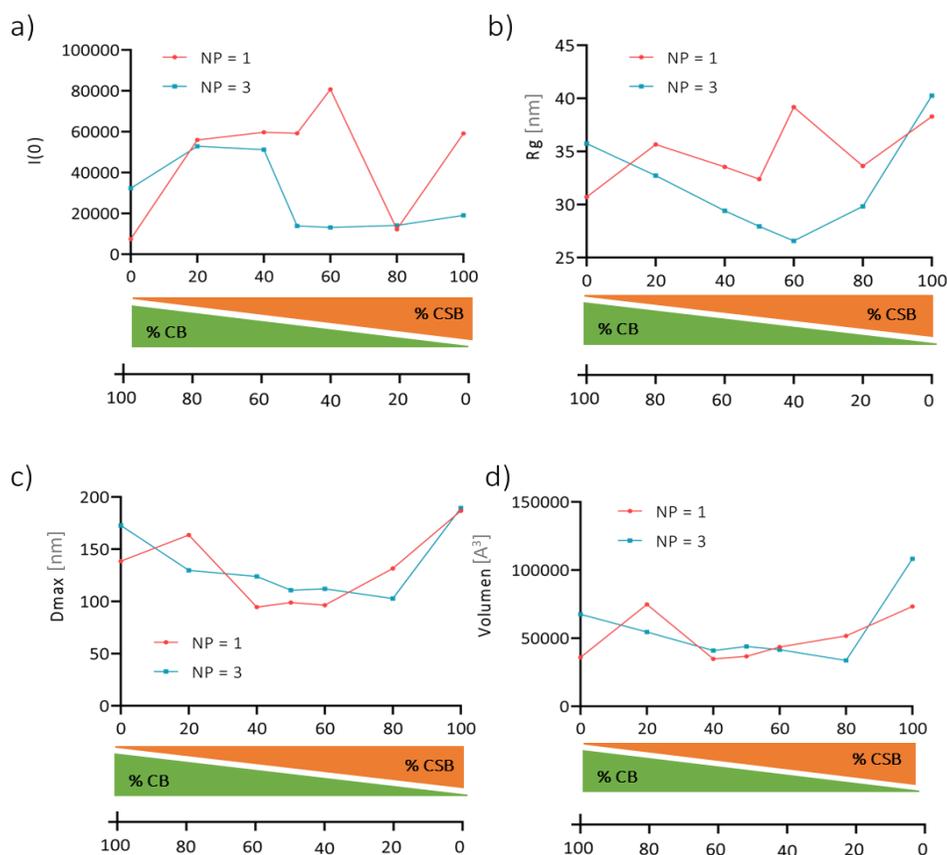


Figura 17. Comparación de los parámetros a) Escala absoluta, b) Radio hidrodinámico, c) Distancia máxima y d) Volumen de las partículas viromiméticas formadas en el sistema multicomponente a N/P = 1 y 3 (78 μM).

En la Figura 18a, se observa que las curvas siguen el mismo comportamiento, a excepción del 0 % CS₁₀B, el cual se aleja un poco de la tendencia central. En N/P = 3 esta tendencia permanece y la presentan la mayoría de los porcentajes, haciendo que la diferencia con 0% de CS₁₀B sea más notoria. Al comparar la forma de estos gráficos con la literatura, se aprecia que las partículas son estructuras alargadas; sin embargo, es difícil distinguir si se trata de una estructura extendida (disco plano) o de un rodillo (ver Figura 5). Este comportamiento es más evidente en 40 – 60 % de CS₁₀B, siendo los 0 y 20 % aquellos sistemas con pendientes más pronunciadas, lo que puede describir partículas con mayor tamaño. Esto es congruente tanto con la composición de la proteína dibloque como del sistema (muestra); pues al tener grandes proporciones de CB, las partículas formadas con DNA no están

empaquetadas, sino cubiertas por la proteína dibloque. Por otra parte, las partículas a 80 – 100% de CS₁₀B poseen un mayor volumen, lo que puede aumentar su dispersión.

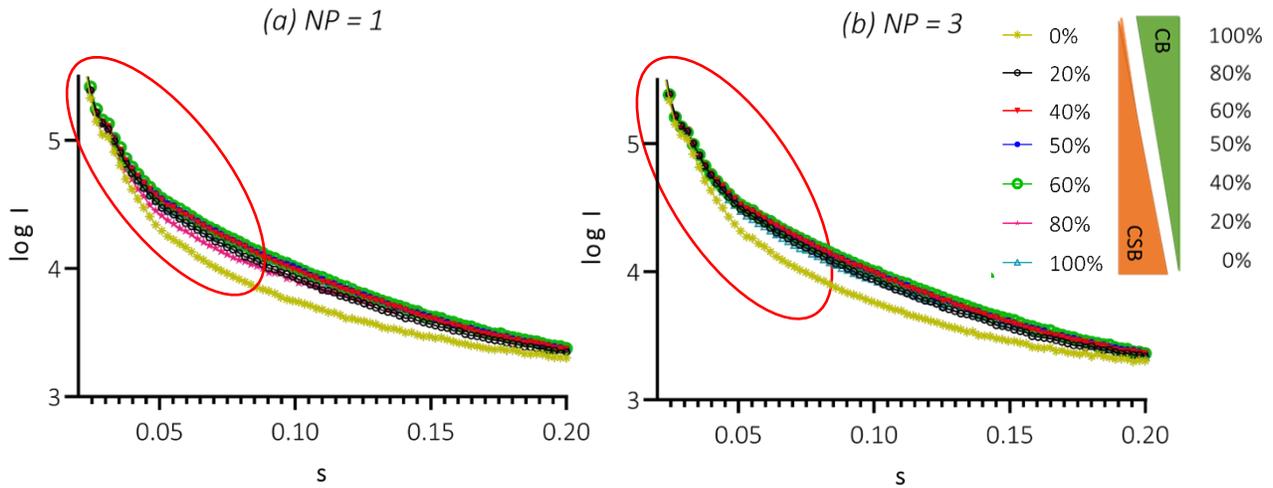


Figura 18. Escala logarítmica de las partículas viromiméticas formadas en el sistema multicomponente a (a) $N/P = 1$ y (b) $N/P = 3$ ($78 \mu M$).

b) Compactibilidad y flexibilidad

Para ambos N/P los porcentajes centrales tienen una forma acampanada más definida con una tendencia ascendente a partir de $s > 0.2$ (Figura 19). Particularmente, para el caso a 0% de CS₁₀B, se muestra que no hay ningún máximo, así como 20 y 80 % de CS₁₀B se salen de la tendencia en $N/P = 1$. A $N/P = 3$ se observa el mismo comportamiento que en $N/P = 1$ pero las gráficas con proteína CS₁₀B se acercan entre sí. Esto indica que las partículas se hacen más compactas con el exceso de proteína y, debido al comportamiento observable en $s > 0.2$, se dice que las partículas poseen una flexibilidad similar en ambos N/P.

La presencia de CB en el medio confiere flexibilidad a las partículas lo que puede atribuirse a su composición (falta del bloque S). Sin

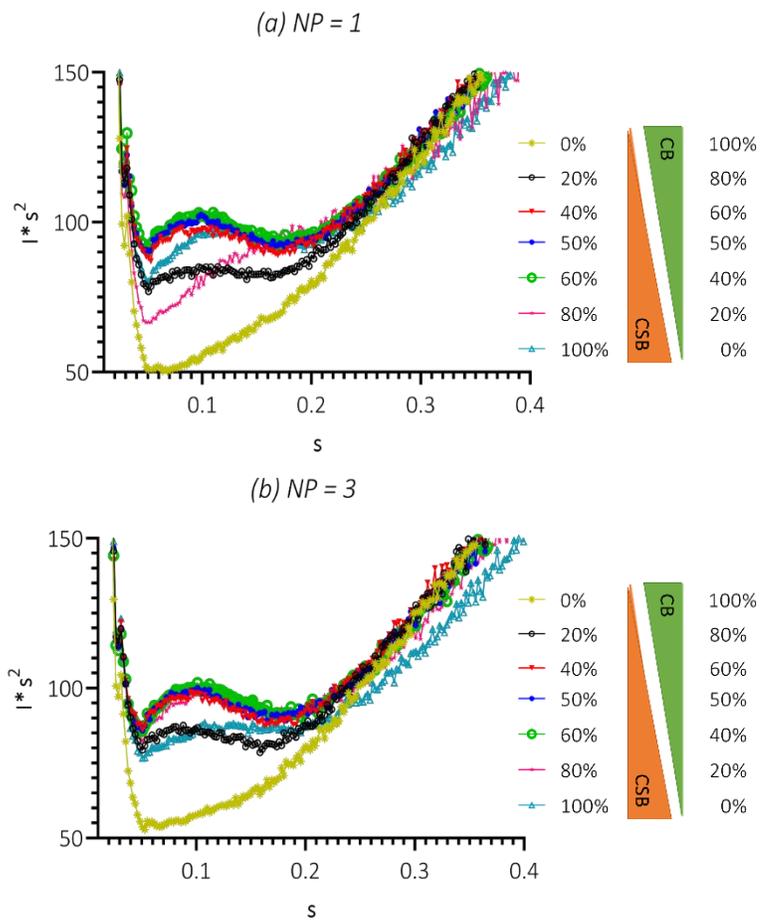


Figura 19. Gráfico de Kratky correspondiente a las partículas viromiméticas formadas en el sistema heterogéneo a (a) $N/P = 1$ y (b) $N/P = 3$ ($78 \mu M$)

embargo, en ambos N/P, las partículas a 100% de CS₁₀B no son las más compactas, lo cual es contrario a lo que se esperaría debido a la presencia del bloque de cooperatividad. En N/P = 3, esto podría explicarse mediante la existencia de pequeños agregados de proteína debido al exceso de esta cuya dispersión contribuye al promedio. Mientras que a N/P = 1, las regiones de DNA sin neutralizar podrían ser un factor importante en la compatibilidad de las partículas.

c) Interacción intermolecular

Todas las curvas para ambos valores de N/P muestran una tendencia ascendente a valores de s^2 cercanos a cero. En este análisis se indica que ambos sistemas tienden a agregarse (Figura 20).

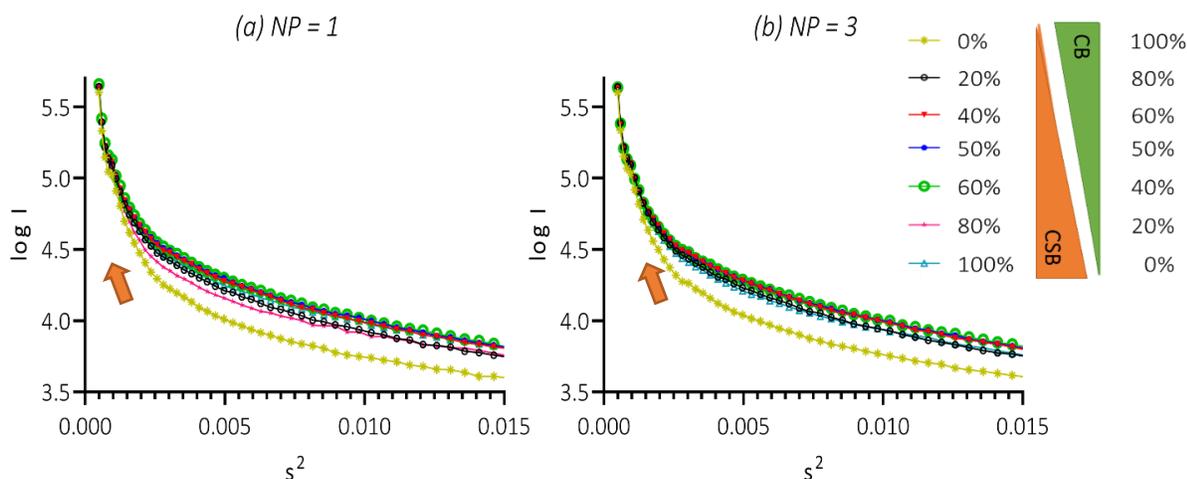


Figura 20. Gráfico de Guinier de las partículas viromiméticas formadas en el sistema multicomponente a (a) N/P = 1 y (b) N/P = 3 (78 μ M)

6. EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)

Se evaluó la movilidad electroforética del DNA (742 pb) frente a proporciones diferentes de proteína CS₁₀B/CB a N/P = 1 y 3. Se observa que a N/P = 1, todos los porcentajes evaluados presentan partículas de diferente peso molecular lo que hace que se observe corrimiento a lo largo del carril (barrido obscuro) (Figura 21a). Aunque este comportamiento puede atribuirse a impurezas de la PCR debido a que se observa en el carril del DNA solo, también se observa que no es homogéneo y es más notorio a 40 % de CS₁₀B y menor a 60 % de CS₁₀B . Además, en 100 % de proteína tribloque, se observa mayor cantidad de DNA desnudo; así como en 0% de CS₁₀B se aprecia que hay especies desde el inicio del carril. Las bandas observadas a N/P = 1 verifican que el DNA no está completamente neutralizado, además, el tamaño y forma de las partículas influyen en la movilidad, pues según lo observado en SAXS, las partículas formadas a 40 – 60 % de CSB son más pequeñas que en el resto de los porcentajes. Sin embargo, en estas condiciones todas las muestras tienen una distribución de partículas de diferente peso molecular, tamaño y forma.

Por el contrario, a N/P = 3 se tiene un menor desplazamiento en todos los porcentajes evaluados (Figura 21b). También, se muestra que hay mayor desplazamiento conforme aumenta el porcentaje de proteína CS₁₀B y disminuye la proteína CB. En este valor de N/P, el DNA no se desliza tanto como

a $N/P = 1$, pues el exceso de proteína favorece la neutralización del DNA, por lo que la movilidad en estas condiciones estaría determinada mayormente por el tamaño, la forma de las nanopartículas y la carga de ellas. Esto explicaría porque las partículas a porcentajes bajos de $CS_{10}B$ tienen menor movilidad, pues si se considera que de 0 - 40 % de $CS_{10}B$, la mayor parte de la proteína es CB, la falta de empaquetamiento de dicha proteína hace que los agregados de proteína – DNA tengan mayor extensión, lo cual limitaría su movilidad a través de la red polimérica del gel de agarosa. De manera análoga, las partículas a 60 – 100 % de $CS_{10}B$ se van haciendo más compactas conforme aumenta la proporción de proteína tribloque favoreciendo la movilidad, recordando que $CS_{10}B$ al tener el bloque S que favorece el empaquetamiento del DNA.

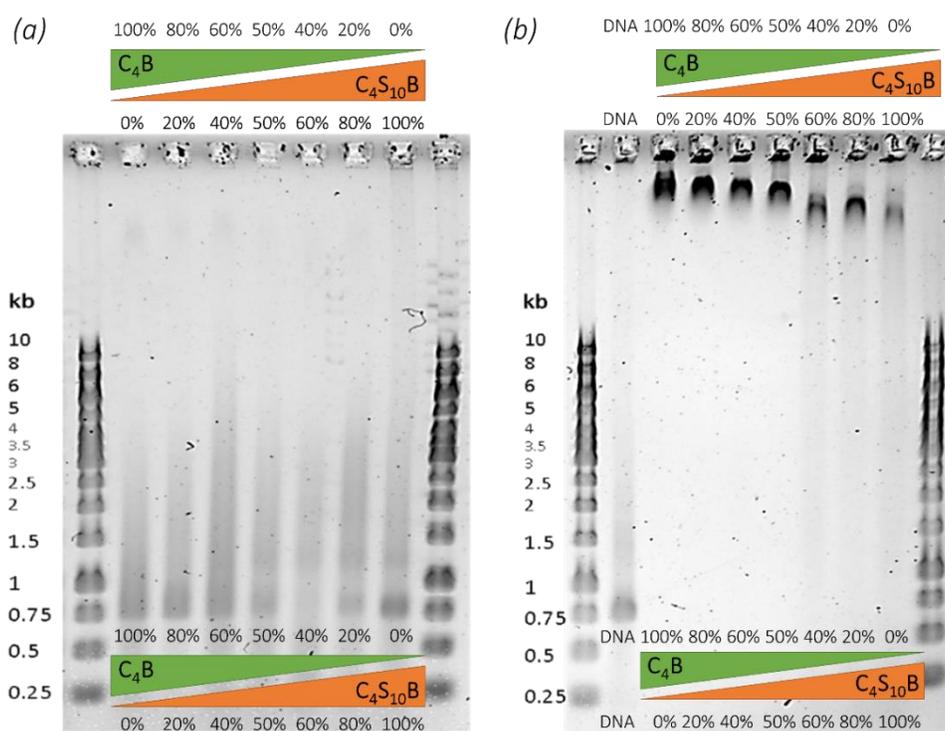


Figura 21. EMSA de las partículas viromiméticas formadas por CS_nB ($n = 0, 10$) - DNA (742 pb) a (a) $N/P = 1$ y (b) $N/P = 3$ en sistema multicomponente.

7. AFM

Finalmente se analizaron las muestras multicomponentes con AFM para poder observar la morfología de las partículas formadas en condiciones secas. Se prepararon muestras a $N/P = 3$ con la cantidad de proteína total constante ($78 \mu\text{M}$) a proporciones variables de proteína CSB y CB y una cantidad constante de DNA de 2,500 bp ($0.3 \mu\text{M}$). Los experimentos se hacen a $N/P = 3$ debido a que existe un mejor recubrimiento del DNA con un exceso de proteína. Se observaron diversas estructuras complejas que dificultan su análisis, sin embargo, se clasificaron y analizaron.

En la Tabla 3 se muestran los parámetros promedio (longitud (L), altura (H) máxima y mínima) de acuerdo con el tipo de estructura observada. Se muestra que las longitudes varían respecto a la proporción de proteína y el empaquetamiento del DNA, el cual varía con el tipo de proteína. Los cúmulos pequeños se atribuyen a la formación de agregados de proteína y algunas de las estructuras lineales se atribuyen a las partículas viromiméticas, ya que forman rodillos debido a CSB. Además, se observan más estructuras lineales de menor longitud conforme aumenta el porcentaje de CSB.

Tabla 3. Parámetros estructurales del gradiente de proteína a N/P = 3.

Proporciones		Tipo de estructura									
		Lineal			Lineales Interconectadas			Cúmulo			
											
	L [nm]	H _{max} [nm]	H _{min} [nm]	L [nm]	H _{max} [nm]	H _{min} [nm]	L [nm]	H _{max} [nm]	H _{min} [nm]		
0%		100%	165.1	2.1	1.0	700.2	2.1	1.1	103.3	2.8	1.2
20%		80%	319.7	53.1	4.2	567.4	1.6	0.2	88.1	3.6	0.3
40%		60%	227.8	4.3	1.9	379.7	2.8	1.1	61.5	2.3	0.9
50%		50%	165.9	4.0	1.6	299.1	3.0	0.7	155.6	19.5	3.4
60%		40%	233.0	3.6	0.8	447.1	3.6	3.5	65.0	5.2	1.2
80%		20%	183.0	4.2	1.5	974.9	4.1	1.5	53.0	4.5	0.4
100%		0%	168.2	4.4	1.2	320.9	4.7	1.5	55.3	6.5	2.2

Por otro lado, las partículas en los porcentajes bajos de CSB son más desestructuradas, con dobleces más arqueados en comparación con porcentajes elevados de CSB (Figura 22a). Mientras que, a porcentajes elevados de CSB, se da la conexión entre fibras originando estructuras muy largas cuyas articulaciones constituyen regiones de mayor grosor, que se muestra en nodos de mayor intensidad en la fibra y esto genera redes constituidas por partículas lineales (Figura 22b). En porcentajes bajos de CSB también se observaron aglomerados de partículas, pero no con la misma definición que los rodillos característicos de CSB.

Es importante considerar que las partículas observadas pueden conformarse por DNA- proteína o proteína- proteína, por lo que la observación de cúmulos de tamaño variable es de esperarse. Hay algunos con forma similar a un óvalo y de mayor extensión que se atribuyen a aglomerados de proteína CB – DNA, lo cual lo hace parecer más desestructurado, debido a la falta de empaquetamiento de dicha proteína.

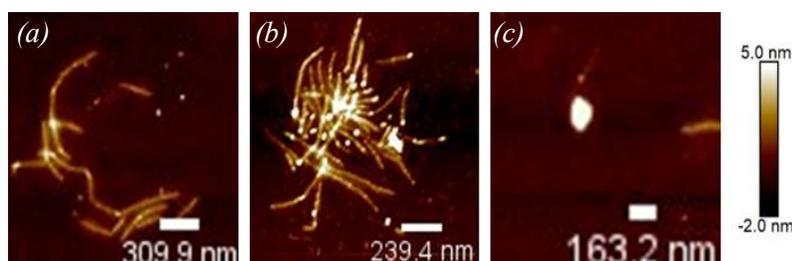
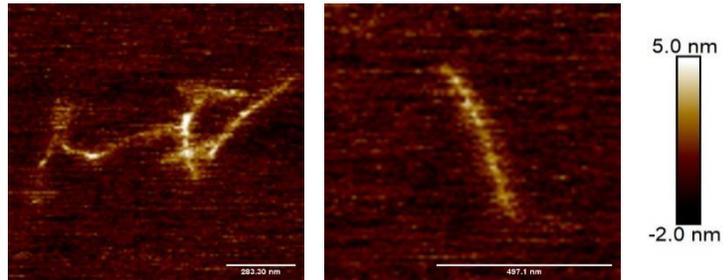


Figura 22. Microscopías de fuerza atómica para varios tipos de nanoestructuras formadas a (a) 20%, (b) 100% y (c) 60% de proteína CS₁₀B con DNA.

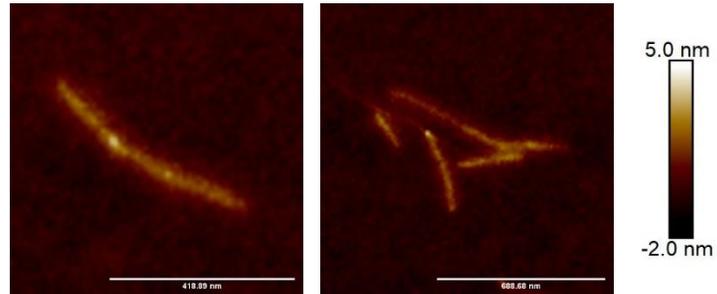
Asimismo, se encuentran pequeños cúmulos con gran intensidad, los cuales se asocian a pequeños núcleos de proteína (Figura 22c).

En las siguientes microscopías se describen las diversas estructuras formadas con las variaciones de proteína. En la escala de color se considera un intervalo entre la menor hasta la mayor altura en la superficie estudiada:

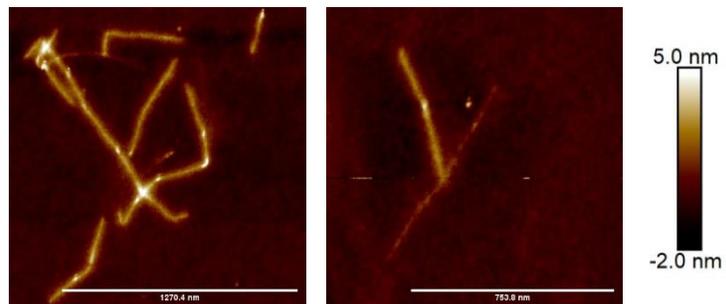
- > 0% CSB, 100% CB: Estructuras alargadas, pero dispersas con dobleces. No hay formación de cúmulos, ni de redes.



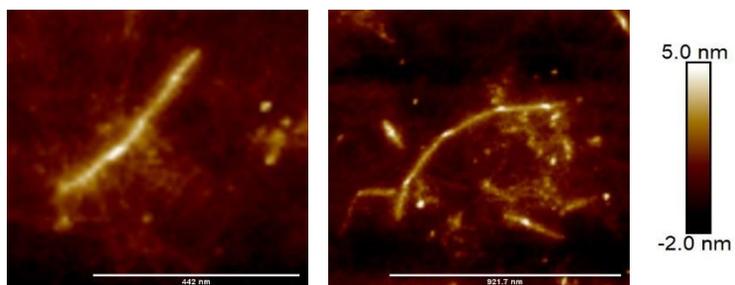
- > 20% CSB, 80% CB: Se aprecia mayor cantidad de partículas lineales y alargadas respecto al porcentaje anterior. Aparecen pequeños cúmulos de partículas y las estructuras formadas tienen dobleces y ramificaciones. Las intersecciones entre partículas parecen ser más altas y son observables en algunos aglomerados de estructuras alargadas con dobleces.



- > 40% CSB, 60% CB: Se observan cúmulos más grandes, estructuras más alargadas con ramificaciones, lo cual implica intersecciones entre partículas. Estas interacciones se remarcan en zonas de mayor intensidad. Aunque parte de esas estructuras parecen DNA sin recubrir debido a la unión con CB.

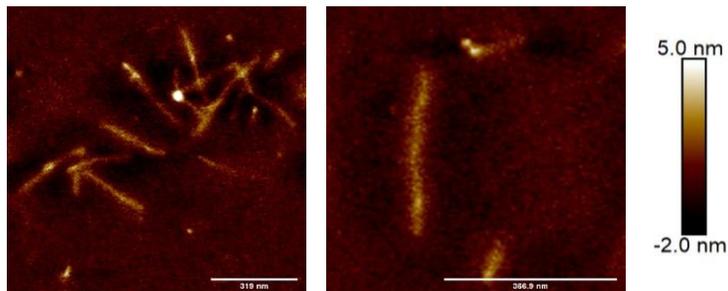


- > 50% CSB, 50% CB: No se observan tantos agregados, más bien son partículas puntuales. Se encuentran algunas formas que parecen DNA sin recubrir, se atribuyen a la presencia de CB, pues los dobleces son curvados, suaves. Sin embargo, se incrementa

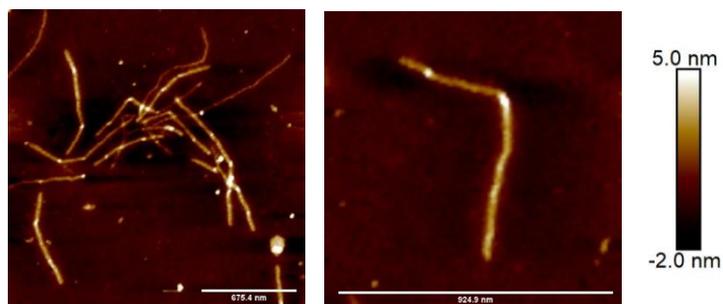


bastante la interacción entre partículas, por lo que hay muchas intersecciones.

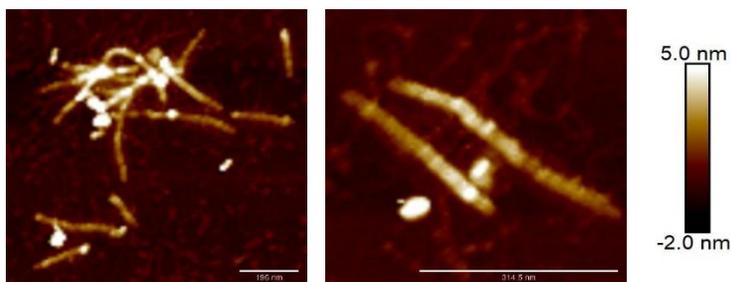
- > 60% CSB, 40% CB: Hay un incremento del número de estructuras alargadas que se interceptan generando redes. También hay estructuras lineales independientes. Se observan pocos cúmulos. Aún hay algunas partículas con curvas más suaves.



- > 80% CSB, 20% CB: Estructuras lineales de menor longitud, mayor cantidad de cúmulos, pero estos son más discretos.



- > 100% CSB, 0% CB: Estructuras alargadas e interconectadas. Se observan cúmulos de proteína en forma de redes y algunas concéntricas.



En lo anterior, se muestra que la forma de las partículas, e incluso, de las redes, varían respecto a la proporción de proteína, lo cual es explicable por el empaquetamiento del DNA por cada tipo de proteína. Esto nos indica que la presencia de la proteína CB les da flexibilidad a las nanopartículas con CSB, pues las proteínas pueden anclarse al DNA de forma intercalada generando partículas alargadas con CSB y DNA interrumpidos por la unión con CB. Sin embargo, no se observa que el aumento de CSB disminuya la conexión entre partículas para la formación de estructuras de mayor complejidad (redes), ni de cúmulos.

(i) Conclusiones

Se estudió la formación de nanopartículas de proteínas CS₁₀B y CB sin y con DNA. Al incrementar la concentración de la proteína se incrementa la intensidad de dispersión. Esto se cumple para ambas proteínas al evaluar la implementación del SEC como parte de la preparación de muestra. Dicho factor no fue un factor determinante en la formación de partículas con y sin DNA, pero mostró una mejora al tener menor cantidad de interferentes en las muestras.

De manera general, la forma de las partículas se describe como rodillo alargado, compacto y parcialmente flexible para la proteína CS₁₀B. Asimismo, en los gráficos de Guinier se indica que para CSB hay tendencia a la agregación. Por el contrario, la proteína CB exhibe un comportamiento más desordenado, menos compacto y mayormente flexible, con repulsión intermolecular que se muestra en la presencia de picos a valores muy bajos de s^2 . En cuanto a los sistemas con DNA, se tienen complejos más compactos a $N/P = 1$ para la proteína CS₁₀B que a $N/P = 0$ y 3.

Por otra parte, al evaluar para un sistema multicomponente, se observó que los parámetros R_g , D_{max} y V_p disminuyen conforme se igualan los porcentajes de CS₁₀B y CB. Las formas de las estructuras propuestas como elipsoides cambian a rodillos conforme se aumenta el porcentaje de CSB. Además, los sistemas tienden a la agregación, sin embargo, esta tendencia se rompe al existir un exceso de proteína CB, lo que genera repulsión intermolecular en las muestras con porcentaje creciente de tal proteína. Asimismo, estos complejos muestran mayor flexibilidad y son menos compactos que aquellos formados por la proteína CS₁₀B. Aunado a esto, las partículas formadas son multidominio con cierta flexibilidad, cuya característica disminuye conforme aumenta el porcentaje de CS₁₀B.

En cuanto a la morfología estudiada mediante AFM, se presume que las estructuras formadas son más rectas, discretas y cortas conforme aumenta el porcentaje de CS₁₀B. Ya que se observó partículas en conformaciones diversas a proporciones mayores de CB, teniendo estructuras más grandes y flexibles. Por otro lado, al estar frente a un exceso de proteína, los pequeños cúmulos pueden estar formados solo por CS_nB libre. Además, existe una superposición de fibras que forman redes, y su cantidad aumenta con el porcentaje de proteína tribloque.

SAXS es una técnica muy útil en el estudio de macromoléculas, pues complementa el conocimiento acerca de sus características en solución y permite estudiar sus interacciones con las entidades presentes en el medio los cambios morfológicos asociados a las interacciones, lo cual puede ser de utilidad en la optimización de estas nanopartículas.

(j) Perspectivas

Se puede afinar el estudio del sistema al hacerlo pasar por SAXS/SEC de tal forma que haya más claridad con la descripción de las partículas que componen el sistema por lo que puede ser el siguiente paso en la dilucidación del comportamiento a diversas condiciones, evaluando nuevamente concentración, tipo de proteína y presencia de DNA. Asimismo, afinar el estudio del DNA de forma individual y el estudio de más valores de N/P dará mayor descripción del comportamiento de las

partículas en el sistema, por lo que también es importante que se evalúen otras condiciones como el tamaño del DNA y su impacto en el “puenteo” entre estructuras.

(k) Referencias

- 1) Roos W. H; et al. Physical virology. *Nat. Phys.* **6**, 733 (2010).
- 2) Cázares Vargas, E., Tesis de Maestría, Instituto de Química, UNAM, 2019.
- 3) Hernández-García, A; et al. Coating of single DNA molecules by genetically engineered protein diblock copolymers. *Small* (2012), **8**(22), 3491 – 3501.
- 4) Hernández-García, A. et al. Design and self-assembly of simple coat proteins for artificial viruses. *Nat. Nanotechnol.* (2014), **9**, 698- 702.
- 5) Cázares Vargas, E; et al. Template-free self-assembly of artificial de Novo viral coat proteins into nanorods: Effects of sequence, concentration, and temperature. *Chem. Eur. J.* 2019, **25**, 11058 – 11065.
- 6) Willems, L; et al. The nature of the amorphous hydrophilic block affects self-assembly of an artificial viral coat polypeptide. *Biomacromolecules*, (2019). **20**. 3641-3647.
- 7) Gräwert, M; Svergun, D. A beginner's guide to solution small-angle X-ray scattering (SAXS). *Biochem (Lond)* 2020; **42** (1): 36–42
- 8) Gräwert, T. W; Svergun, D. I. Structural Modeling Using Solution Small-Angle X—ray Scattering (SAXS). *Journal of Molecular Biology.* (2020). **432**, 3078- 3092.
- 9) Kikhney, A.G., Svergun, D.I., A practical guide to small angle X-ray scattering (SAXS) of flexible and intrinsically disordered proteins, *FEBS Letters*, **589** (2015) 2570–2577
- 10) Jeffries, C. M; et al. Preparing monodisperse macromolecular samples for successful biological small-angle X-ray and neutron-scattering experiments. *Nature protocols*, (2016), **11**(11), 2122– 2153.
- 11) Da Vela, S; Svergun, D.I. Methods, development and applications of small-angle X-ray scattering to characterize biological macromolecules in solution. *Current Research in Structural Biology*, (2020), **2**, 164–170.
- 12) Svergun, D. I. y Koch, M. H. J. Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution. *Rep. Prog. Phys.* (2003), **661**, 735–1782.
- 13) Definiciones de la información estructural obtenida por SAXS. Consultado el 28 de julio de 2022, extraído desde <http://www.bioisis.net/tutorials>
- 14) Manalastas-Cantos, K; et al. ATSAS 3.0: Expanded functionality and new tools for small-angle scattering data analysis. *Journal of Applied Crystallography.* (2021). **54**. 343-355.
- 15) Small Angle X-ray Scattering/Diffraction at the Stanford Synchrotron Radiation Lightsource. Consultado el 03 de abril de 2023 desde: <https://www-ssrl.slac.stanford.edu/smb-saxs/content>
- 16) Putnam CD, et al. X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Q Rev Biophys.* (2007). **40**(3):191-285.

A. Preparación de muestras de SAXS

Esquema 1. Experimentos realizados para la caracterización del sistema por SAXS

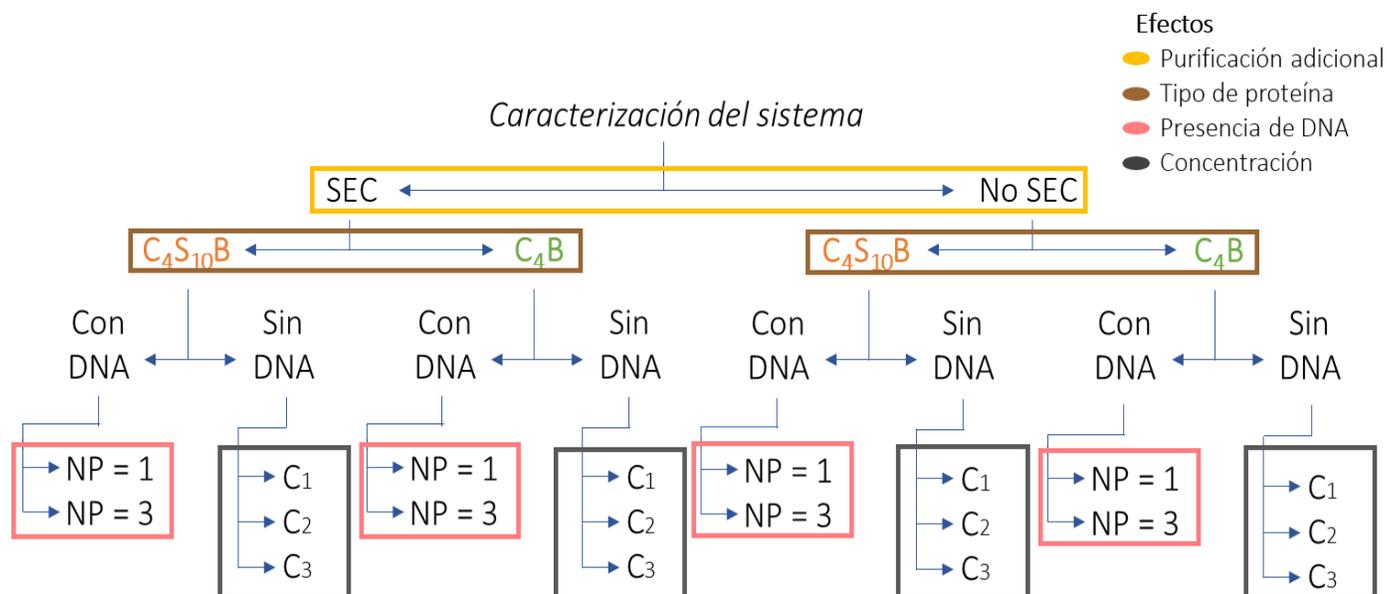


Tabla 4. Composición de las muestras correspondientes a la caracterización del sistema (concentraciones equivalentes en molaridad de carga)

C₄S₁₀B (con SEC, sin SEC)		C₄B (con SEC, sin SEC)	
# exp	Concentración [μ M]	# exp	Concentración [μ M]
1, 4	22	7, 10	22
2, 5	40	8, 11	40
3, 6	78	9, 12	78
C₄S₁₀B (con SEC, sin SEC)		C₄B (con SEC, sin SEC)	
# exp	Concentración [μ M]	# exp	Concentración [μ M]
13, 15	40	17, 19	40
14, 16	40	18, 20	40
DNA 742 pb			
# exp	Concentración [μ M]	# exp	Concentración [μ M]
21	7.5	22	2.5

Esquema 2. Experimentos realizados para el gradiente de proteínas C_4S_nB

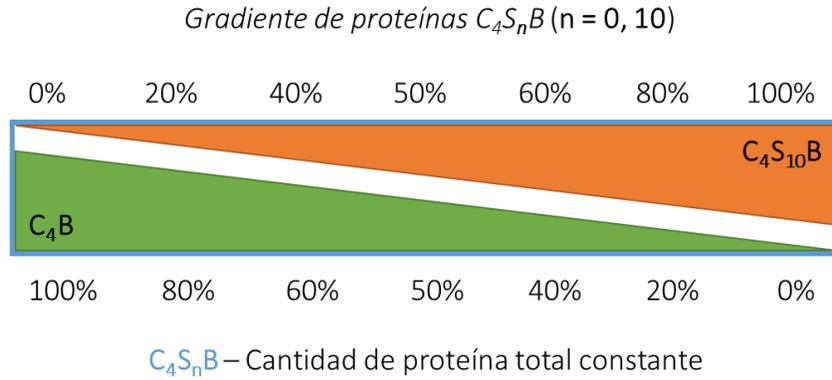


Tabla 5. Composición de las muestras correspondientes al gradiente de proteínas

N/P	1 (1-7)			3 (8-14)				
DNA [mg/ml]	0.3			0.1				
Muestra	$C_4S_{10}B$			C_4B			C_4S_nB	
	%	Conc. [mg/ml]	n A [nmol]	%	Conc. [mg/ml]	n B [nmol]	Conc. [mg/ml]	n P _T [nmol]
1,8	0	0.00	0.00	100	3.00	3.12	3.00	3.12
2,9	20	0.70	0.63	80	2.40	2.50	3.10	3.13
3,10	40	1.40	1.25	60	1.80	1.87	3.20	3.13
4,11	50	1.75	1.56	50	1.50	1.56	3.25	3.13
5,12	60	2.10	1.88	40	1.20	1.25	3.30	3.13
6,13	80	2.80	2.50	20	0.60	0.62	3.40	3.13
7,14	100	3.50	3.13	0	0.00	0.00	3.50	3.13

B. SDS-PAGE de las fracciones colectadas de SEC

Figura 23. SDS.PAGE de las fracciones colectadas de una muestra de CB

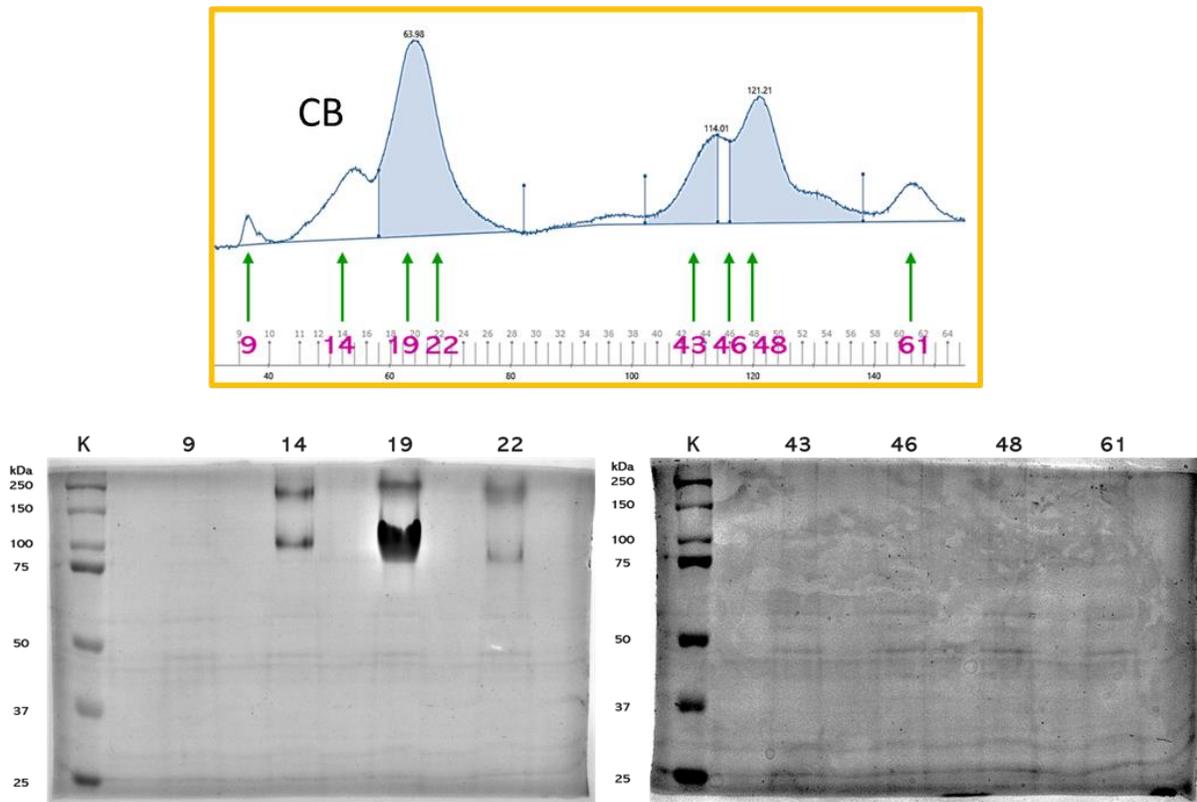


Figura 24. SDS.PAGE de las fracciones colectadas de una muestra de CS₁₀B

