



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO



---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

“ESTUDIO DEL ENSAMBLADO Y ESTABILIDAD  
DE CAPSÓMEROS Y CÁPSIDES DEL  
PARVOVIRUS B19”

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**

**P R E S E N T A:**  
M. en C. SANDRA PAOLA SÁNCHEZ RODRÍGUEZ

TUTOR: Dr. ISMAEL BUSTOS JAIMES

MÉXICO, D. F.

02/2012



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.



---

# “ESTUDIO DEL ENSAMBLADO Y ESTABILIDAD DE CAPSÓMEROS Y CÁPSIDES DEL PARVOVIRUS B19”

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. Ismael Bustos Jaimes en el Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco	Facultad de Medicina, UNAM
Dra. Gloria Saab Rincón	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dr. Ismael Bustos Jaimes	Facultad de Medicina, UNAM

Se reconoce la colaboración del Dr. Jonathan Dordick, del CBIS (Center for Biotechnology and Interdisciplinary Studies, RPI, USA), en cuyo laboratorio se realizó una estancia de 6 meses y se llevaron a cabo diversos estudios de ensamble y caracterización.

Se reconoce la colaboración del Dr. Gerardo Vázquez Nin y de la Dra. Olga Echeverría de la Facultad de Ciencias en cuyo laboratorio se realizaron análisis de microscopía de transmisión electrónica.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (99857) e ICYTDF (PIFUTP08-104). Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Rafael Vázquez Duhalt	Instituto de Biotecnología, UNAM
Vocal	Dr. Miguel Costas Basín	Facultad de Química, UNAM
Secretario	Dra. Gloria Saab Rincón	Instituto de Biotecnología, UNAM
Suplente	Dra. Georgina Garza Ramos Martínez	Facultad de Medicina, UNAM
Suplente	Dra. Adela Rodríguez Romero	Instituto de Química, UNAM.



---

## AGRADECIMIENTOS

- ① A la Universidad Nacional Autónoma de México, me siento privilegiada de haber aprovechado por tantos años de toda su infraestructura y de tantos excelentes profesores. Mejor preparación profesional no pude tener. ¡Siempre seré orgullosamente PUMA!
- ① Al Dr. Ismael Bustos por permitirme participar en este proyecto, gracias por el apoyo y la confianza; por siempre sentir libertad para experimentar y por todo lo aprendido.
- ① A los doctores que integran el laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas, por siempre estar al pendiente de que contáramos con los recursos necesarios para trabajar. También gracias por sus sugerencias y aportaciones durante los seminarios.
- ① A todos mis compañeros y amigos del laboratorio, no me gustaría omitir a nadie, así es que un agradecimiento general por contribuir a crear un ambiente de trabajo agradable y uno muy especial a aquellos que en algún momento me brindaron su valiosa ayuda para obtener algún avance en mi proyecto.
- ① A los doctores miembros de mi comité tutorial: Dra. Gloria Saab y Dr. Alejandro Fernández por su importante colaboración, atención y recomendaciones durante el desarrollo de este proyecto.
- ① Al Dr. Jonathan Dordick por la estancia de investigación que me permitió desarrollar en su laboratorio en el CBIS en RPI, Estados Unidos. Además de ser una muy buena experiencia académica en la que logré obtener bastantes avances en mi proyecto, también fue una gran experiencia personal.



- A los miembros de mi jurado: Dra. Gloria Saab, Dra. Georgina Garza, Dra. Adela Rodríguez, Dr. Rafael Vazquez y Dr. Miguel Costas por sus comentarios y sugerencias que permitieron mejorar éste trabajo.

*“Mientras los hombres sean libres para preguntar lo que deben; libres para decir lo que piensan; libres para pensar lo que quieran; la libertad nunca se perderá y la ciencia nunca retrocederá”.*

*J. Oppenheimer*



---

## DEDICATORIAS

Es muy gratificante para mí el poder repetir ésta dedicatoria...

Este trabajo no sólo es el fruto de más de 4 años de investigación con cientos de horas de trabajo en el laboratorio, ni de decenas de fines de semana sacrificados, ni de todas las horas de estudio desde pequeña; también es el fruto de todas las personas que han aportado un grano de arena para ser la persona que ahora soy. Ésta tesis es uno de los logros más importantes en mi vida y representa un punto y seguido en mi formación profesional y en mi trayectoria personal. En especial quisiera dedicarla:

- ⦿ A mis padres por su amor, apoyo incondicional y sacrificios que me permitieron alcanzar éste logro. Los amo profundamente.
- ⦿ A mis cuatro hermanas, Chio, Ursu, Marichu y Mony. Por que sé que puedo contar con ellas en cualquier momento que lo necesite. Su compañía ha sido muy importante e indispensable, me ha motivado a salir siempre adelante.
- ⦿ A toda mi familia, tíos, primos, sobrinos y en especial a mis abues Lolita y Eva por su cariño, por tener la fortuna de seguir contando con su amorosa compañía y por servirme de ejemplo de que siempre vale la pena luchar para salir adelante y brindar lo mejor de nosotros.
- ⦿ A todos mis amigos, durante estos 4 años he tenido la oportunidad de comenzar nuevas amistades y de fortalecer otras. No quiero omitir a nadie así es que muchas gracias a todos los que me han demostrado que puedo contar con ellos; gracias por que sus consejos, compañía y apoyo fueron muy valiosos para poder concluir mi trabajo. Gracias a los que se que nuestra amistad es para toda la vida, saben que de corazón es retribuida.



*Dale vida a tus sueños...  
Dale vida a los sueños que alimentan el alma,  
no los confundas nunca con realidades vanas.  
Y aunque tu mente sienta necesidad, humana,  
de conseguir las metas y de escalar montañas,  
nunca rompas tus sueños, porque matas el alma.*

*Dale vida a tus sueños aunque te llamen loco,  
no los dejes que mueran de hastío, poco a poco,  
no les rompas las alas, que son de fantasía,  
y déjalos que vuelen contigo en compañía.*

*Dale vida a tus sueños y, con ellos volando,  
tocarás las estrellas y el viento, susurrando,  
te contará secretos que para ti ha guardado  
y sentirás el cuerpo con caricias, bañado,  
del alma que despierta para estar a tu lado.*

*Dale vida a los sueños que tienes escondidos,  
descubrirás que puedes vivir estos momentos con  
los ojos abiertos y los miedos dormidos,  
con los ojos cerrados y los sueños despierto.*

*Mario Benedetti*



## ÍNDICE

RESUMEN .....	9
ABSTRACT.....	10
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
1.1. Virus y nanotecnología.....	11
1.2. Producción de VLPs.....	16
1.3. Purificación de las VLPs.....	20
1.4. Técnicas para la caracterización de VLPs.....	21
1.5. Mecanismo de ensamble de las VLPs.....	23
1.6. Factores que afectan el ensamble de las VLPs.....	28
1.7. Principales aplicaciones de las VLPs.....	29
1.7. Parvovirus B19.....	34
1.8. VLPs del Parvovirus B19.....	38
<b>2. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>41</b>
<b>3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>41</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>42</b>
Objetivo General .....	42
Objetivos Particulares .....	42
<b>5. METODOLOGÍA .....</b>	<b>43</b>
5.1. Recuperación y purificación de la proteína VP2.....	44
5.1.1. Clonación del gen <i>vp2</i> en el vector pET22b(+). .....	44
5.1.2. Expresión de la proteína VP2 en <i>Escherichia coli</i> . .....	44
5.1.2.1. Efecto de la concentración de IPTG y del tiempo de inducción.....	44
5.1.3. Identificación de cuerpos de inclusión.....	45
5.1.4. Expresión de la proteína VP2.....	45
5.1.5. Purificación de la proteína VP2.....	45
5.1.5.1. Lisis de las células y recuperación de los cuerpos de inclusión.....	46
5.1.5.2. Lavado de los cuerpos de inclusión.....	46
5.1.5.3. Solubilización de cuerpos de inclusión.....	46
5.1.5.4. Purificación de la proteína VP2 mediante filtración en gel en condiciones desnaturalizantes.....	46
5.1.6. Inclusión de una etiqueta de histidinas en el extremo C-terminal de la proteína VP2. .....	47
5.1.7. Expresión de la proteína VP2-His en <i>E. coli</i> .....	49
5.1.8. Escalamiento de la expresión de la proteína VP2-His.....	49
5.1.9. Purificación de la proteína VP2-His.....	49
5.1.9.1. Limpieza de cuerpos de inclusión.....	50
5.1.9.2. Solubilización de cuerpos de inclusión.....	50
5.1.9.3. Purificación final mediante cromatografía de afinidad.....	50
5.2. Ensamble <i>in vitro</i> de las VLPs a partir de la proteína VP2-His solubilizada en GuHCl 5 M.....	51
5.2.1. Caracterización de las VLPs ensambladas.....	51
5.2.1.1. Determinación del porcentaje de proteína soluble después de la diálisis.....	52
5.2.1.2. Microscopía de transmisión electrónica (TEM).....	53
5.2.1.3. Dispersión dinámica de luz (DLS).....	53
5.2.1.4. Gradientes continuos de cloruro de cesio (CsCl).....	53
5.2.1.5. Ultracentrifugación analítica.....	54





5.2.1.6. Inmunodetección de proteínas (Western blot). .....	54
5.2.2. Efecto de la concentración inicial de GuHCl en el ensamble de las VLPs. ....	55
5.2.3. Ensamble de las VLPs por cambio de pH. ....	55
5.2.4 Efecto de la temperatura en el ensamble de las VLPs. ....	56
5.2.5. Efecto de la concentración de proteína inicial. ....	56
5.3. Estudios de estabilidad. ....	56
5.3.1. El efecto de temperatura sobre la estabilidad de las VLPs. ....	56
5.3.2. Efecto del SDS en la desagregación y desensamble de las VLPs. ....	57
5.3.3. Estudios de re-ensamble de las VLPs por remoción del SDS. ....	59
5.3.4. Efecto de la urea y del GuHCl en la desagregación y desensamble de las VLPs. ....	60
5.4. Efecto de la arginina durante el ensamble de las VLPs. ....	60
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ....	61
6.1. Producción y recuperación de la proteína estructural VP2. ....	61
6.1.2. Purificación de la proteína VP2 a partir de cuerpos de inclusión. ....	64
6.1.3. Inclusión de una etiqueta de histidinas en el extremo C-terminal de la proteína VP2. ....	66
6.1.4. Purificación de la Proteína VP2-His. ....	67
6.2. Ensamble <i>in vitro</i> de las VLPs del PB19 a partir de la proteína VP2-His. ....	68
6.2.1. Efecto del pH y la fuerza iónica. ....	68
6.2.2. Ensamble de las VLPs a partir de los intermediarios formados en pH 4 con 0.25 M de NaCl. ....	72
6.2.3. Efecto de la concentración de GuHCl durante el ensamble de las VLPs. ....	74
6.2.4. Caracterización de ensamble en amortiguador PBS (pH 7.4). ....	75
6.2.5. Efecto de la temperatura en el ensamble de las VLPs. ....	76
6.2.6. Efecto de la concentración de proteína durante el ensamble. ....	78
6.3. Estabilidad de las VLPs. ....	80
6.3.1. Efecto del SDS en la desagregación y desensamble de las VLPs. ....	80
6.3.2. Re-ensamble de las VLPs por eliminación del SDS. ....	88
6.3.3. Efecto de la Urea y del GuHCl en la desagregación y desensamble de las VLPs. ....	90
6.3.4. Efecto de la temperatura en la estabilidad de las partículas. ....	94
6.4. Efecto de la arginina durante el ensamble y estabilidad de las VLPs. ....	97
6.4.1. Efecto de la arginina y pH durante el ensamble. ....	97
6.4.2. Comparación del efecto del SDS y temperatura en las VLPs ensambladas en ausencia y presencia de 0.5 M de arginina. ....	101
7. CONCLUSIONES GENERALES. ....	104
8. CONCLUSIONES PARCIALES. ....	106
9. PERSPECTIVAS. ....	107
10. BIBLIOGRAFÍA. ....	108
11. ANEXOS. ....	117



---

## RESUMEN

En años recientes, las partículas tipo virus (VLPs) han ganado interés en el campo de la nanobiotecnología como templados orgánicos para el desarrollo de nuevos biomateriales, el desarrollo de vacunas y como vectores moleculares. Las proteínas estructurales virales han sido expresadas en una variedad de sistemas heterólogos, pero su ensamble permanece como un proceso muy poco entendido. Muchos estudios se han enfocado en definir los principales requerimientos para el ensamble de las VLPs, ya que este proceso es indispensable para su aplicación, por ejemplo en la encapsulación de moléculas para la liberación tejido-específica de fármacos, ácidos nucleicos, partículas magnéticas y auxiliares de imagenología molecular. El Parvovirus B19 (PB19) es un agente infeccioso para humanos. Por esta razón, las VLPs derivadas de este virus tienen un enorme potencial en el campo biomédico. En este trabajo se estudiaron los parámetros fisicoquímicos que afectan el ensamble y estabilidad de las VLPs del PB19. Se demostró que se puede llevar a cabo el ensamble de las VLPs completamente *in vitro* a partir de la proteína recombinante VP2 del PB19. Nuestros resultados indican que el rendimiento y la morfología dependen fuertemente del pH, la fuerza iónica, la temperatura y la concentración de arginina en que se lleve a cabo el ensamble. Las VLPs generadas presentaron alta estabilidad a la temperatura, ya que una fracción significativa mantiene su estructura después de exponerlas a 80°C durante 30 min. Por el contrario, las VLPs fueron altamente sensibles a concentraciones muy bajas de SDS (0.02%), aunque el efecto desestabilizante fue más drástico con urea o GuHCl.



---

## ABSTRACT

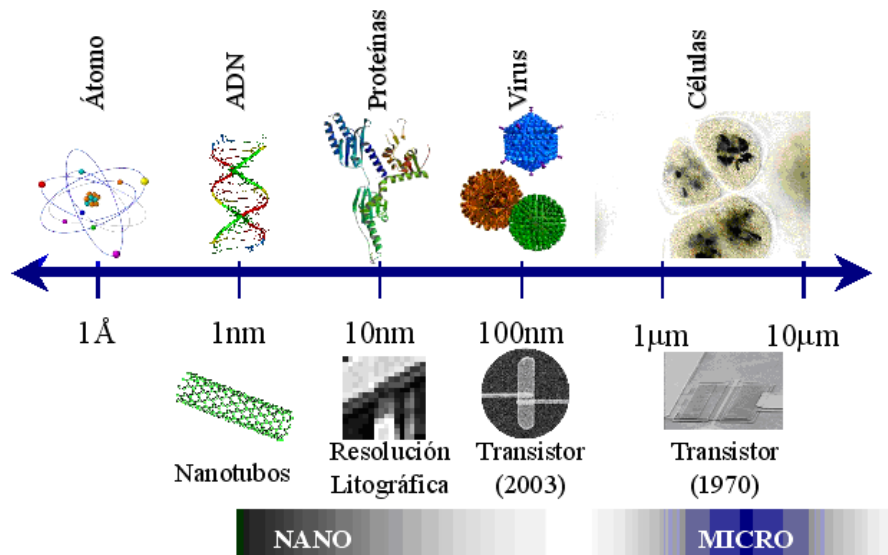
In the last years, virus-like particles (VLPs) have gained ground in the field of nanobiotechnology as organic templates for developing new biomaterials, vaccines and as molecular delivery devices. Viral structural proteins have been successfully expressed in a variety of heterologous expression systems and their assembly remains as a poorly understood process. Many studies have been focused in defining the main requirements for the assembly of VLPs, because this process is essential for their application, for example in encapsulation of molecules for tissue-specific release of drugs, nucleic acids, magnetic and auxiliary particles of molecular imagenology. Parvovirus B19 (PB19) is an infectious agent for humans. For this reason, VLPs derived from this virus has an enormous potential in the biomedical field. In this research, we studied the physicochemical conditions influencing the *in vitro* assembly and stability of PB19-derived VLPs. It was demonstrated that VLPs assembly could be carried out completely *in vitro* from the recombinant VP2 protein from PB19. Our results show that the yield of assembly and the morphology of VLPs strongly depend on pH, ionic strength, temperature and arginine concentration. The *in vitro* self-assembled VLPs are very stable to high temperatures, as a significant fraction of particles remain assembled after incubation for 30 min at 80°C. On the other hand, VLPs were highly sensible to very low concentrations of SDS (0,02%), although the destabilizing effect was more drastic either with urea or GuHCl.



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Virus y nanotecnología.

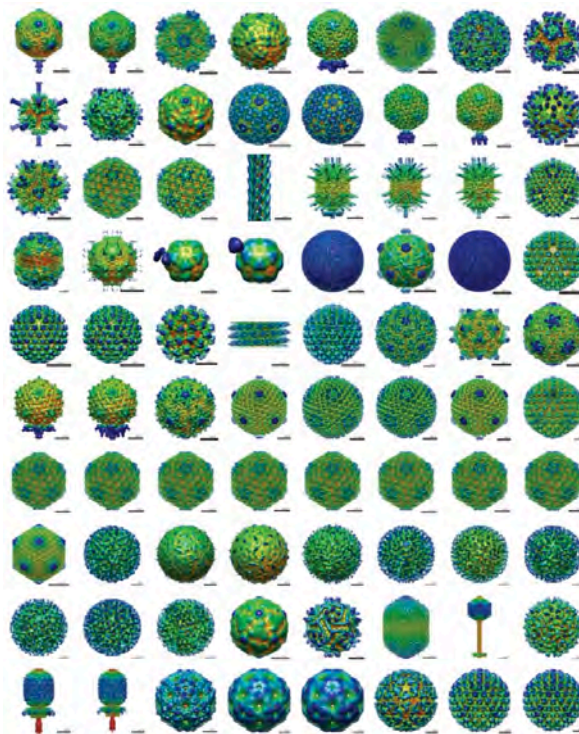
La nanotecnología es una ciencia multidisciplinaria que involucra la creación y utilización de estructuras, sistemas y dispositivos a escala nanométrica. El campo de la nanotecnología actualmente está experimentando un gran desarrollo, si se compara con otras áreas de investigación. Esta ciencia aplica los principios de ingeniería, electrónica, física, ciencia de materiales y manufacturación a nivel atómico o molecular. La nanociencia trata con estructuras que van desde el tamaño de algunos virus hasta las dimensiones moleculares (Figura 1). Se espera que la nanotecnología provoque avances significativos en el campo biomédico, no sólo en terapia génica y liberación de medicamentos, sino también en imagen molecular, biomarcadores y biosensores (Ernest y Shetty, 2005). La terapia mediante medicamentos con señalizaciones específicas y los métodos para un diagnóstico rápido de patologías, son las áreas de investigación prioritarias en donde la nanobiotecnología podría jugar un papel muy importante o vital, específicamente es aquí donde los virus podrían tener una gran variedad de aplicaciones (Jain, 2005).



**Figura 1.** Escala de dimensiones mostrando diferentes moléculas y estructuras. Comparación de estructuras de origen natural y manufacturadas artificialmente.



Los virus están continuamente sujetos a investigación debido a su variedad y a su potencial patogénico. Recientemente, en varias investigaciones se han reconocido a las cápsides de los virus como bloques versátiles para la construcción de nuevos nanomateriales, ya que estas cápsides se encuentran entre los más impresionantes ejemplos de reconocimiento molecular, con tamaños, formas, propiedades estructurales y reactividades químicas muy variadas (Chen *et al.*, 2001; Ochoa *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2002, Singh *et al.*, 2006) (Figura 2).

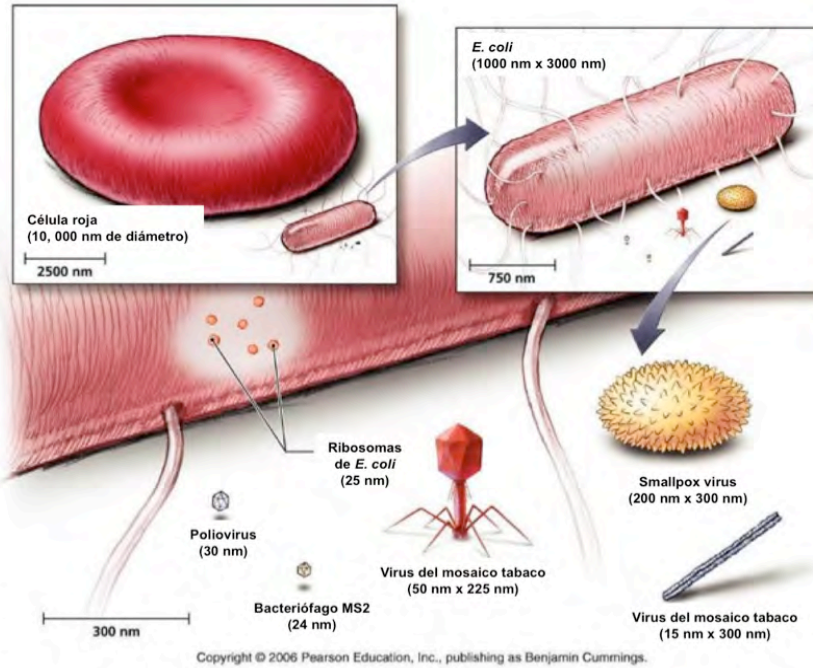


**Figura 2.** Modelos estructurales de diversos virus. [http://www.pdbj.org/emnavi/emnavi\\_gallery.php](http://www.pdbj.org/emnavi/emnavi_gallery.php).

Los virus varían ampliamente en tamaño y forma, son estructuras extraordinariamente pequeñas cuyo tamaño oscila entre los 28 nm de los poliovirus a los 300 nm de los poxvirus. Para darnos una idea de qué tan pequeños son los virus, se podrían insertar 2000 bacteriófagos dentro de una célula bacteriana o más de 50 millones de poliovirus dentro de una célula humana (Figura 3). Quizás el primer reporte escrito sobre la infección por un virus consiste en un jeroglífico en Egipto, dibujado en el año 3700 a.c., donde se ve a un sacerdote mostrando signos clínicos típicos de poliomielitis. La primera referencia sobre la existencia de los virus se debe al botánico



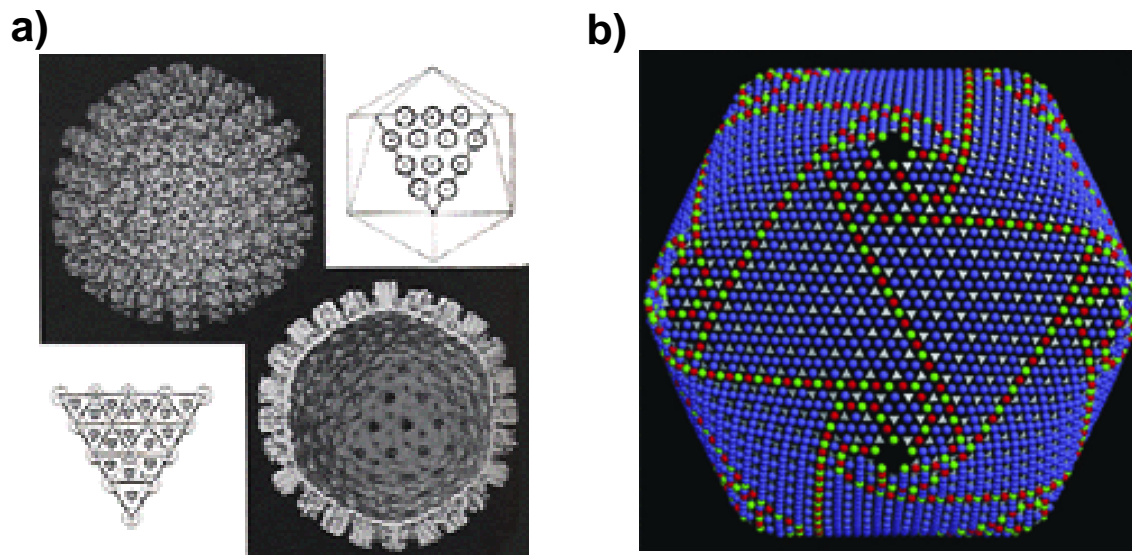
ruso Dimitri Ivanovsky quien en 1892 buscaba el agente causante de la enfermedad denominada mosaico del tabaco, y llegó a la conclusión de que debía de tratarse de una toxina o de un organismo más pequeño que las bacterias, pues el agente atravesaba los filtros que retenían a las bacterias (Cann, 2007).



**Figura 3.** Dimensiones de diferentes virus y su comparación con una célula humana y una bacteriana.

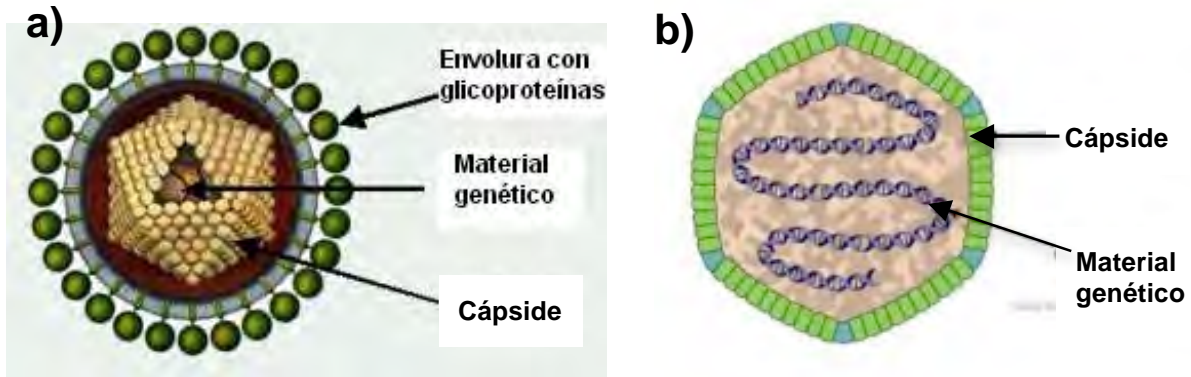
Los virus pueden considerarse como ensamblajes supramoleculares naturales que se componen de una capa protectora externa, llamada cápside viral, que cubre y protege al genoma del virus. Los capsómeros son las unidades de construcción de las cápsides y pueden estar formados por una o varias copias de una misma subunidad proteica o en algunos casos de más de una subunidad (Figura 4a). La organización de los capsómeros le da a la cápside una forma geométrica característica. Esta distribución espacial de las proteínas permite que se forme un arreglo supramolecular homogéneo en el cual, sus elementos químicos y estructurales se repiten de manera periódica a lo largo de la cápside viral (Figura 4b).





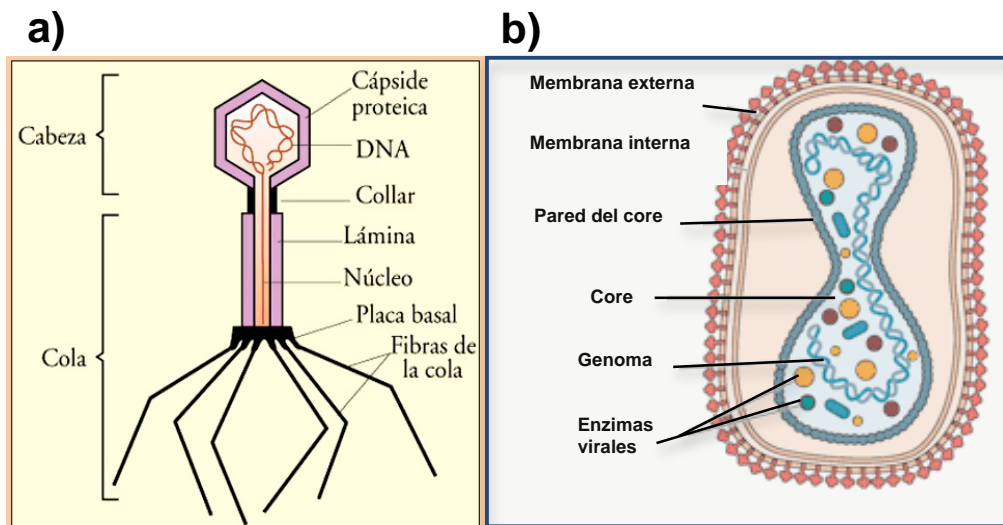
**Figura 4.** a) La organización estructural de los capsómeros proporciona una morfología característica a las cápsides de los virus. b) Distribución codificada por colores de las tres clases de contactos entre capsómeros del virus icosaédrico dsDNA *Paramecium bursaria Chlorella*. (Baker y Dauter, 2003).

Algunos virus presentan membranas lipídicas en su superficie (virus envueltos), que son tomadas de la célula que infectan (Figura 5a). Estas membranas incluyen proteínas que proveen especificidad al virus para infectar a una célula en particular (*targeting proteins*). Los virus que no presentan envoltura lipídica generalmente son llamados "virus desnudos" (Figura 5b). El material genético puede encontrarse en una gran variedad de configuraciones, incluyendo cadenas lineales sencillas o dobles de ADN o ARN, o bien en forma circular. Aunque ésta es la estructura básica de un virus, algunos de ellos también pueden añadir a esto la presencia de alguna enzima, ya sea junto al ácido nucleico, como la transcriptasa inversa de los retrovirus, o bien en la envoltura para facilitar la apertura de la membrana de la célula hospedera. Para que el ácido nucleico pueda replicarse, necesita utilizar la maquinaria enzimática y estructural de una célula viva, y por otra parte, solamente dentro de una célula viva los virus tienen las funciones de autoconservación, que junto con la reproducción, caracterizan a los seres vivos (Singh *et al.*, 2006). Para fines biotecnológicos son mucho más útiles los virus no envueltos debido a que es más fácil su producción en sistemas heterólogos mediante métodos genéticos.



**Figura 5.** Estructura y composición de a) un virus envuelto y b) un virus desnudo.

También existen virus complejos, un ejemplo son los bacteriófagos que infectan células bacterianas. Estos virus tienen una estructura bastante complicada y elaborada. El bacteriófago T4, consta de 5 proteínas y de las siguientes partes: cabeza (contiene la información genética), cola, un cuello o collar, placa basal y unas fibras a modo de patas (Figura 6a). Otro ejemplo de un virus complejo es el de la viruela, que infecta células humanas. Este virus tiene varias capas lipídicas cubiertas de una cápside proteica (Figura 6b).



**Figura 6.** a) Estructura de un virus bacteriófago y b) Estructura de el virus de la viruela.

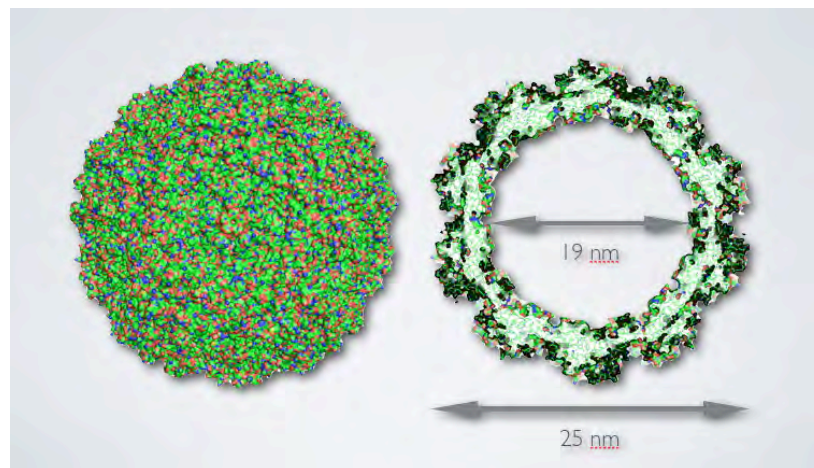




Una de las características más importantes de los virus es su potencial para el reconocimiento específico de células. Son el sistema de introducción de material genético heterólogo más eficiente que se conoce y por esta razón han llamado poderosamente la atención como vectores para la entrega de ácidos nucleicos y para la liberación específica de fármacos (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2010). Para su aplicación se ha propuesto la producción de Partículas Tipo Virus (de sus siglas en inglés VLPs, Virus Like Particles), las cuales son estructuralmente idénticas a los virus nativos, pero sin la presencia de su material genético, por lo que no son infecciosas (Noad *et al.*, 2003; Plumer *et al.*, 2010; Ludwing *et al.*, 2007).

## 1.2. Producción de VLPs.

Las VLPs se obtienen a partir de la expresión heteróloga de las proteínas que conforman la cápside. Pueden considerarse como cubiertas de proteínas que muestran similitud estructural y morfológica a los virus nativos, pero con la ventaja de no ser infecciosas (Singh *et al.*, 2006) (Figura 7). Las VLPs de virus icosaédricos se han producido con éxito, principalmente con propósitos terapéuticos como son vacunas o vectores para la liberación sitio-específica de genes, proteínas o medicamentos. Un ejemplo reciente de la importancia de las VLPs es la aprobación por la FDA de la vacuna contra el virus del papiloma humano (Gardasil) (Sharma *et al.*, 2007).



**Figura 7.** Modelo estructural de las VLPs de un virus icosaédrico.



Diferentes sistemas de expresión han sido utilizados para la producción de las proteínas que conforman la cápside de diversos virus, por ejemplo líneas celulares de mamíferos y plantas, el sistema baculovirus-células de insecto, varias especies de levaduras como *Sacharomyces* y *Pichia pastoris*, y bacterias como *Escherichia coli* y *Pseudomonas* (Santi *et al.*, 2006, Grgacic, *et al.*, 2006, Schneeman, *et al.*, 2003, Clark *et al.*, 2009, Lowin *et al.*, 2005, Mukherjee *et al.*, 2008). Cada uno de estos sistemas tiene sus ventajas y limitaciones, como se muestra en la Tabla 1 (Pattenden *et al.*, 2005).

**Tabla 1.** Comparación de diversos sistemas de expresión para la producción de VLPs

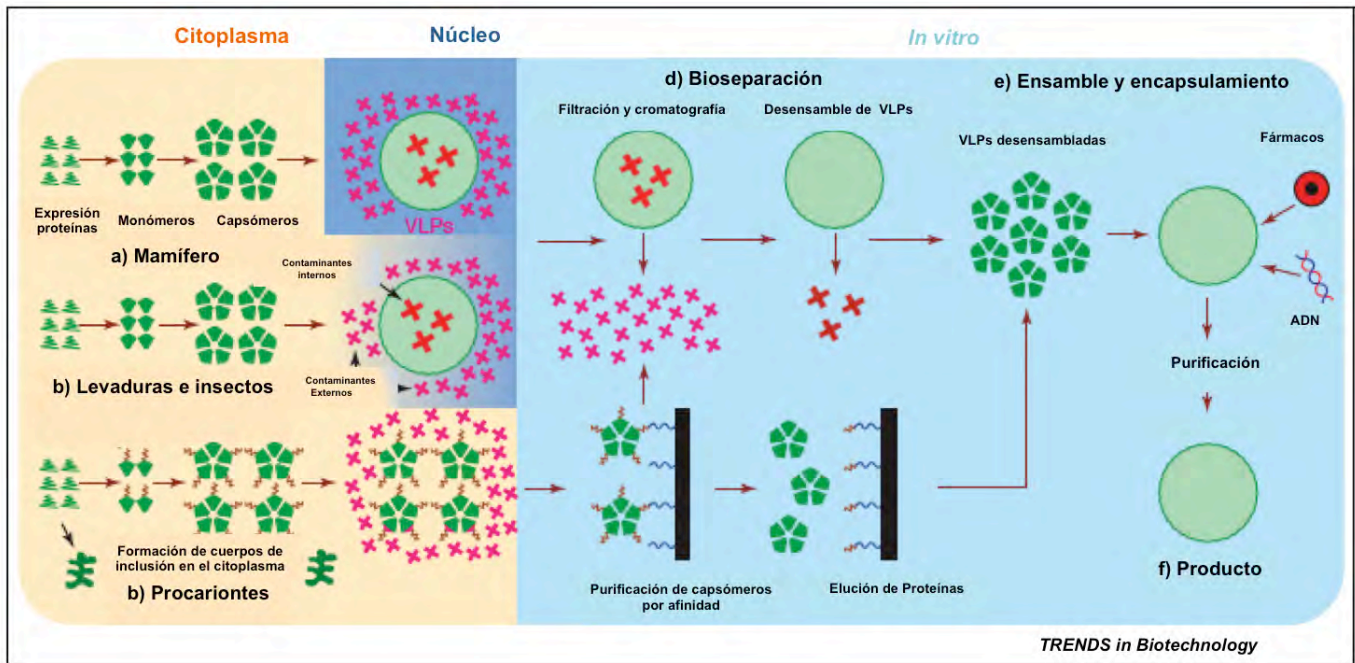
Sistema de expresión	Ejemplo de VLPs	Comentarios
Bacteria	Poliomavirus, papilomavirus	Sistema de expresión simple y de bajo costo, factible para la producción de proteínas de fagos bacterianos. La eficiencia de expresión es variable y el rendimiento de proteína soluble puede ser bajo. No permite el ensamble de VLPs de virus de mamíferos. No se llevan a cabo modificaciones post-traduccionales.
Levadura	Poliomavirus, papilomavirus, virus de la hepatitis	Sistema de expresión simple y de bajo costo, generalmente permite el ensamble de proteínas estructurales virales en VLPs solubles.
Células de insecto	Poliomavirus, papilomavirus, rotavirus, calicivirus, norivirus	Eficiencia de expresión relativamente baja, por lo que el costo es alto, pero permite el ensamble de las proteínas estructurales virales en VLPs solubles.
Células de mamífero	Retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados, virus de Epstein-Barr	Este sistema permite obtener virus nativos. Es un método muy costoso con baja eficiencia. Diversos contaminantes pueden ser incorporados dentro de las partículas. Se pueden obtener diversas modificaciones post-traduccionales.

(Pattenden *et al.*, 2005).

Generalmente en sistemas de expresión eucariontes, las partículas tienen la capacidad de autoensamblarse *in vivo*, por lo que después de lisar las células es posible separarlas de una gran variedad de contaminantes (Figura 8). El método de producción *in vivo*, involucra la síntesis, plegamiento ordenado y asociación cuaternaria de las proteínas que conforman la cápside, todo esto dentro de la célula. El ensamble puede ocurrir, ya sea espontáneamente en el citoplasma por asociación de las



subunidades proteicas, o en alguna interface, como la membrana (Pattenden *et al.*, 2005). Muchas VLPs pueden contener fragmentos de ADN en su interior que provienen de la célula y que deben de ser removidos *ex vivo* para que las partículas puedan tener alguna aplicación farmacéutica. Para esto, se necesita establecer un proceso de desensamble y reensamble *in vitro*, que también podría ser aprovechado para la incorporación de moléculas que tengan algún interés biomédico.



**Figura 8.** Esquema general para la producción de VLPs (Pattenden *et al.*, 2005).

Hasta ahora el sistema baculovirus es el mas ampliamente estudiado y utilizado para la producción de VLPs (Schneemann *et al.*, 2003; Clark *et al.*, 2009). Actualmente hay varios sistemas de expresión comerciales, basados en baculovirus y que son viables de replicarse en *E. coli* (bácmidos). En estos sistemas, primero se introducen los genes heterólogos en el bácmido y posteriormente se purifica de las células de *E. coli*, para así transformar células de insecto que sean permisivas (Bieniossek et al, 2008). Los sistemas de expresión eucariontes pueden ser importantes para la producción de VLPs que requieran alguna modificación post-traduccional (glicosilación



---

o fosforilación). La necesidad de adicionar un paso de desensamble y reensamble al proceso de producción de VLPs en células eucariontes, los rendimientos bajos, así como la dificultad para obtener partículas homogéneas, ha incrementado el interés por encontrar y aplicar sistemas de producción alternativos. Dentro de éstos se encuentra el uso de plantas, bacterias y levaduras. De todos estos, los sistemas basados en bacterias y levaduras han sido los más viables debido a la facilidad de expresión, de escalamiento y a los costos de producción (Willits *et al.*, 2003, Zhao *et al.*, 1995). La principal dificultad para la producción de VLPs en bacterias es obtener proteína y partículas solubles que estén libres de toxinas, proteínas de choque térmico y proteínas chaperonas, que podrían permanecer unidas a los capsómeros, creando bastantes dificultades durante la purificación (Pattenden *et al.*, 2005). La degradación por proteasas también puede contribuir a obtener bajos rendimientos y una baja homogeneidad en la arquitectura de las VLPs (Stubenrauch *et al.*, 2000). Si se demuestra que se puede llevar a cabo el ensamble *in vitro*, partiendo de cuerpos de inclusión, éste podría ser un sistema muy factible para la producción de las partículas, ya que el rendimiento de proteína es muy alto.

Es importante mencionar que la selección del sistema de expresión depende de un gran número de factores y debe estar en función de la naturaleza de las VLPs y del uso que se les quiera dar. Para su uso directo, por ejemplo como vacunas, un sistema de autoensamble directo como baculovirus puede ser más viable. Sin embargo, para la inclusión de fármacos, ácidos nucleicos o dispositivos para imagen molecular en el interior de las partículas, podría ser mejor el uso de bacterias, ya que se podría aprovechar el desplegamiento de los cuerpos de inclusión y posterior replegamiento de las proteínas y ensamble de las VLPs para hacer a la par el proceso de encapsulamiento. En cualquier escenario, ya sea partículas ensambladas *in vivo* o *in vitro*, la pureza de las VLPs es crítica para su uso en pruebas clínicas o para la aplicación final que se les pretenda dar.



---

### 1.3. Purificación de las VLPs.

Se ha propuesto el uso de diversas técnicas para la purificación de VLPs; por ejemplo la ultrafiltración para remover proteínas de bajo peso molecular, así como gradientes de sacarosa y cloruro de cesio o cromatografía, para aislar y concentrar las partículas. Los diferentes métodos pueden ser combinados dependiendo de las propiedades específicas de las partículas virales a ser purificadas. Por ejemplo, las partículas derivadas del virus de la leucemia murina fueron purificadas por una combinación de micro y ultrafiltración que permitió la clarificación de las muestras y concentración de las partículas virales. Con un paso de cromatografía de intercambio iónico y de exclusión molecular, se incrementó la pureza a un 99% (Rodrigues *et al.* 2007). En otro ejemplo, las VLPs derivadas del adenovirus fueron purificadas por una combinación de cromatografía de intercambio iónico en columna y de adsorción en cama expandida. Este paso permitió recuperar las partículas directamente de las células o del extracto después de lissarlas sin la necesidad de un paso previo para la remoción de sólidos suspendidos, permitiendo una menor manipulación de la muestra. La pureza final fue similar a la obtenida por gradientes de CsCl mientras que el rendimiento fue 8 veces más alto que el obtenido con otras metodologías (Peixoto *et al.*, 2006).

Así como el proceso de ensamble, el proceso de purificación también depende de la naturaleza de las partículas, por ejemplo si deben ser aisladas de una célula de planta, de insecto o de bacteria o si es que las partículas se encuentran solubles o si se debe partir de cuerpos de inclusión, monómeros o capsómeros. Generalmente las VLPs se extraen de las células mediante lisis celular, utilizando algún amortiguador hipotónico de lisis o algún método mecánico y posteriormente se purifican mediante ultracentrifugación en gradientes de sacarosa o de cloruro de cesio (Kawase *et al.*, 1995; Sico *et al.*, 2002). La Tabla del anexo 1 resume diversas condiciones utilizadas para la producción de VLPs de algunos virus, los métodos utilizados para su purificación, así como los rendimientos de partículas o proteína obtenida.



---

#### 1.4. Técnicas para la caracterización de VLPs.

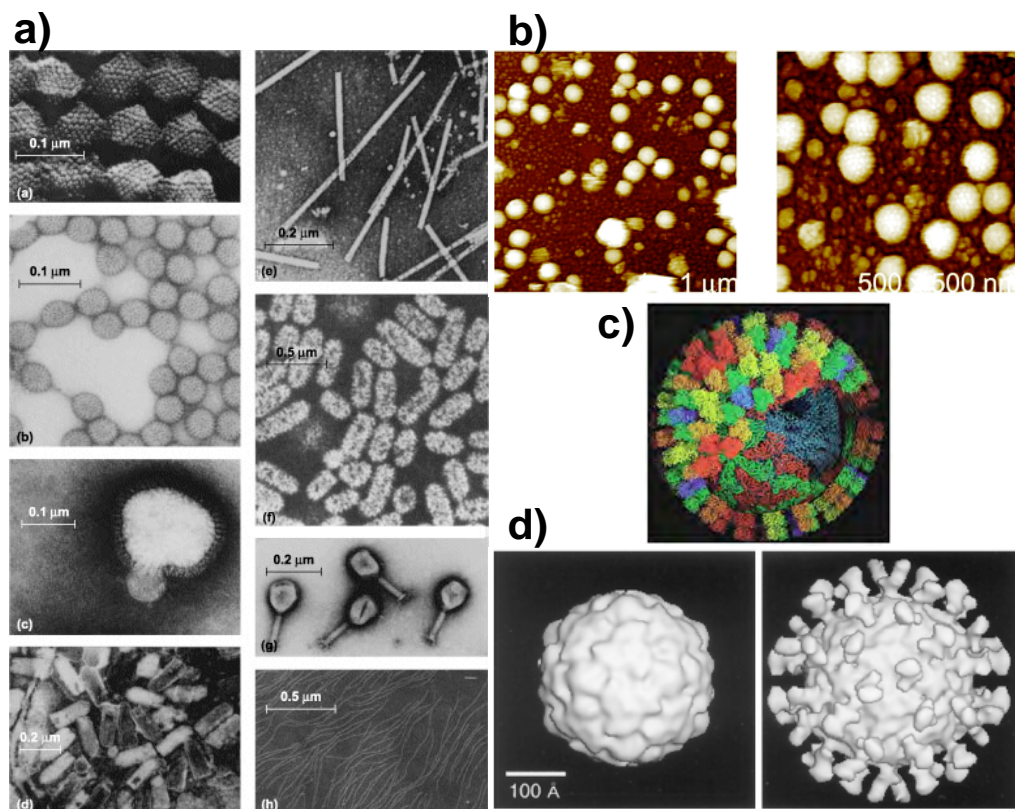
Lo métodos utilizados para demostrar e identificar la presencia de partículas virales, así como su estabilidad, se basan en estudiar sus propiedades morfológicas y sus propiedades estructurales. La microscopía electrónica de transmisión (TEM) es una de las técnicas básicas para estudiar la morfología de los virus, utilizando tinción negativa con metales pesados (por ejemplo acetato de uranilo) que ayudan a acentuar la estructura de la superficie viral (Figura 9a). Actualmente una técnica alternativa es la microscopía de fuerza atómica, ya que permite preservar la estructura de los virus debido a que pueden ser visualizados en solución (Figura 9b). Además permite revelar las características de partículas individuales e identificar algún defecto o anomalía estructural (Kuznetsov et al., 2005, Kuznetsov 2005). Sin embargo, para aumentar más la resolución a una escala atómica, sería conveniente utilizar la cristalografía de rayos X, pero es necesario que el virus pueda ser cristalizado (Figura 9c). En algunos casos sólo se pueden cristalizar los componentes individuales del virus, que posteriormente pueden ayudar a definir la estructura total del virus, tomando también en cuenta la información obtenida por otras técnicas tales como microscopia electrónica. Como se mencionó anteriormente, la estructura de muchos virus no puede ser analizada por cristalografía de rayos X debido a la dificultad para obtener cristales que difracten. La microscopía crio-electrónica y la reconstrucción 3D (Cryo-EM) ha emergido como un método muy promisorio para determinar la estructura de diversos complejos supramoleculares (Figura 9d). Esta técnica permite la reconstrucción tridimensional de los virus, dependiendo de la simetría de las partículas. Además de identificar la morfología, también permite estudiar la organización y forma de sus componentes, ya que se pueden obtener imágenes a una resolución muy cercana a la atómica (alrededor de 3 Å) (Baker et al., 1999; Tang et al., 2009).

Algunos métodos mas indirectos que permiten complementar los análisis estructurales de las partículas, son por ejemplo la dispersión dinámica de luz (DLS), la cromatografía de exclusión molecular (SEC), la ultracentrifugación analítica y los gradientes de sacarosa o CsCl (Mach et al., 2006; Kissmann et al., 2010). Ha sido demostrado que durante la separación y subsecuente cuantificación de las diferentes





especies que pudieran obtenerse después del ensamble (VLPs, fragmentos, monómeros, dímeros, trímeros y agregados) es posible usar varias de estas técnicas para definir el tamaño de las partículas. Los estudios también se pueden complementar con técnicas espectroscópicas como la fluorescencia y el dicroísmo circular para identificar características y cambios en la estructura terciaria y secundaria de las cápsides y sus proteínas. Esto permite realizar una caracterización cuantitativa del ensamble y por otro lado estudiar su estabilidad (Alonso *et al.*, 2004; Carriera *et al.*, 2004).



**Figura 9.** a) Micrografías obtenidas por microscopía de transmisión electrónica de diversos virus y VLPs. b) Imágenes obtenidas mediante microscopía de fuerza atómica de las VLPs del retrotransposón Ty3 (Kuznetsov *et al.*, 2005). c) Estructura cristalográfica del virus bluetongue (BTV), con un diámetro de 70 nm, se ilustran en detalle atómico alrededor de 1000 subunidades de proteína que se autoensamblan e interaccionan para formar un compartimento que es activo transcripcionalmente (Jaeger, 2005). d) Imágenes obtenidas mediante Cryo-EM del virus HVR16 (izquierda) y del complejo HRV16-D1D2 (derecha) (Baker *et al.*, 1999).



---

## 1.5. Mecanismo de ensamble de las VLPs.

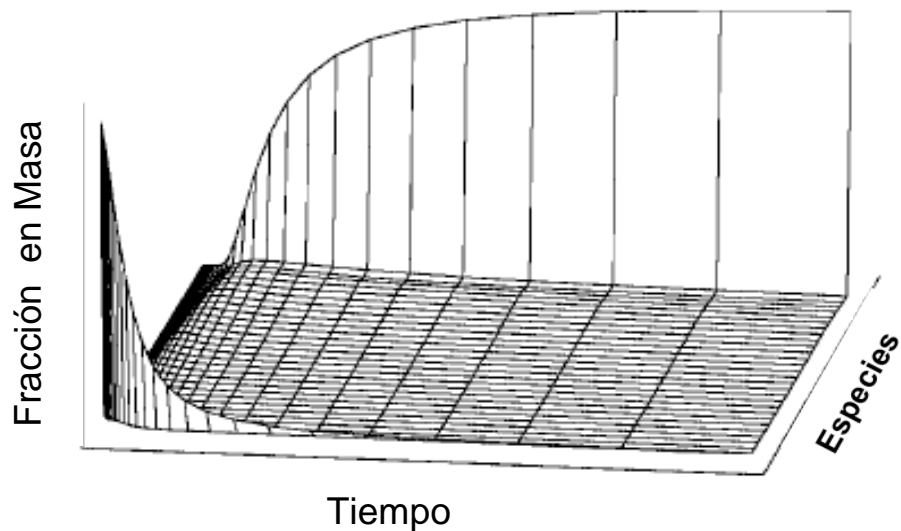
Es importante conocer los mecanismos de ensamble de las VLPs, para comprender su interacción con los receptores de la superficie celular y con los anticuerpos. Además para su manipulación y poder usarlas, por ejemplo, en el encapsulamiento y la transferencia específica de fármacos. Las VLPs sirven como un buen sistema modelo para estudiar el ensamble de complejos macromoleculares. Sin embargo este proceso está poco estudiado, pues no se conoce bien la cinética, termodinámica y el mecanismo de ensamble. Los procesos existentes a nivel laboratorio, aunque demuestran la formación de las partículas, son limitados por no ser viables para un control preciso de ensamble, llevando en algunas ocasiones a la formación de agregados contaminantes. Puede ser deducido que el autoensamble involucra una variedad de interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y covalentes (puentes disulfuro). Aunque el autoensamble es usualmente espontáneo bajo condiciones favorables, también se tiene evidencia de que ciertas proteínas pueden ser requeridas como catalizadores para que algunas partículas virales se puedan ensamblar en algunos sistemas biológicos (Dokland, 1999).

El mecanismo de ensamble es difícil de establecer debido a que la polimerización ocurre rápidamente, conduciéndose generalmente con alta fidelidad (Liljas, 1999). El ensamble de los virus se puede describir como un equilibrio entre cápsides, intermediarios de ensamble y subunidades proteicas. En el equilibrio, las cápsides y las subunidades libres son las especies dominantes, generalmente los intermediarios de ensamble sólo pueden ser encontrados en concentraciones traza. Sin embargo, el número de estados intermediarios en esas reacciones puede ser enorme, esta es una situación análoga al problema de plegamiento de proteínas. Existe muy poca información experimental que describa la energía de unión entre subunidades, las velocidades y orden de reacción durante el ensamble y la formación de estructuras de nucleación (Endres y Zlotnick, 2002). Una de las maneras para atrapar o identificar los intermediarios en las diferentes etapas de ensamble es mediante mutagénesis de las proteínas estructurales, seguida por su expresión y su caracterización estructural.

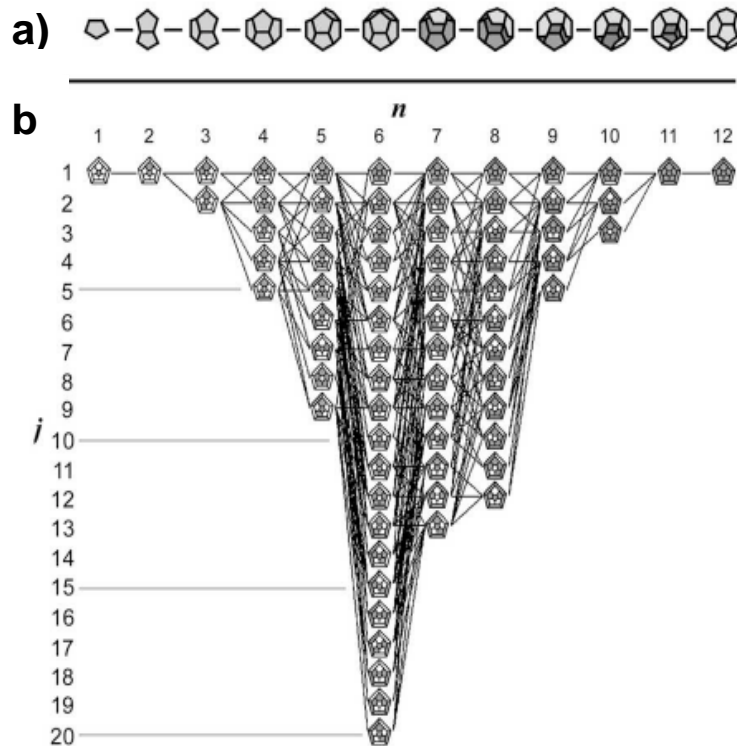




Se han desarrollado modelos matemáticos basados en cinética y termodinámica para entender como se da el ensamble de las cápsides (Figura 10) (Zlotnick *et al.*, 1999; Zlotnick, *et al.*, 2000; Endres y Zlotnick, 2002). La acumulación de cápsides presenta una cinética sigmoideal típica de una serie de reacciones en equilibrio (reacciones multipaso), diferenciándose tres etapas (una lenta, otra de ensamble rápido y la última asintótica) que pueden ser asociadas con características bien definidas de cascadas de reacción (Figura 11). La etapa inicial es lenta y está caracterizada por la construcción secuencial de intermediarios de ensamble (oligocapsómeros). Durante la fase rápida se dispara la concentración de cápsides, ya que los capsómeros libres reaccionan con los intermediarios efectuándose una conversión casi constante de capsómeros libres a cápsides (Endres y Zlotnick, 2002). También se han descrito escenarios de reacción definidos por el número de capsómeros de cada especie, la predicción de la frecuencia de cada especie y la estabilidad de las especies (Figura 12) (Endres *et al.*, 2005).

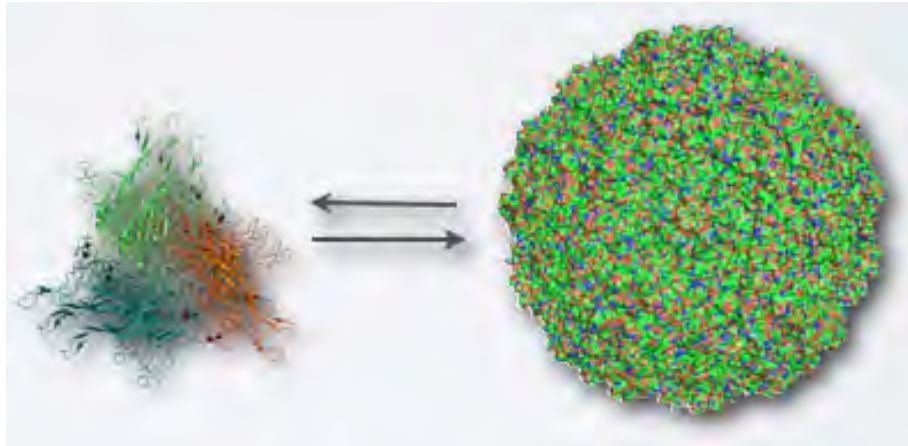


**Figura 10.** Cinéticas de ensamble calculadas para un modelo icosaédrico. La cascada de reacciones exhibe la cinética sigmoideal obtenida experimentalmente para el ensamble de una cápside *in vitro*. La concentración de subunidades disminuye. Los intermediarios se forman durante la fase *lag* y posteriormente muy lento hasta un equilibrio. Después de que todos los intermediarios son sintetizados, la formación de cápsides comienza rápidamente (Endres y Zlotnick, 2002).



**Figura 11.** Modelo mostrando los caminos e intermediarios formados durante el ensamblaje de una cápside dodecaedra. a) Un solo camino de ensamblaje a partir de los intermediarios más estables y B) La secuencia completa de caminos de ensamblaje mostrando las 73 especies que pueden presentarse para formar el dodecaedro, como una proyección de dimensiones (Diagrama de Schlegel) (Endres *et al.*, 2005).

Las cápsides de virus esféricos pueden contener de decenas a cientos de copias de capsómeros (Endres *et al.*, 2005). El número de proteínas dentro de cada capsómero (unidad asimétrica icosaédrica) se denomina número de triangulación T (Zlotnick, 1994). La morfología de la cápside puede presentarse como  $60T$  monómeros,  $20T$  trímeros o formando  $10(T-1)$  hexámeros y exactamente 12 pentámeros. Por ejemplo, en el caso específico de los parvovirus, se ha propuesto que para que las partículas víricas adquieran una forma icosaédrica es necesaria la construcción de 20 triángulos equiláteros (capsómeros). Cada triángulo es simétrico y se conforma de tres subunidades proteicas asimétricas que posteriormente llevarán a que la cápside adquiera una conformación icosaédrica (Figura 12).

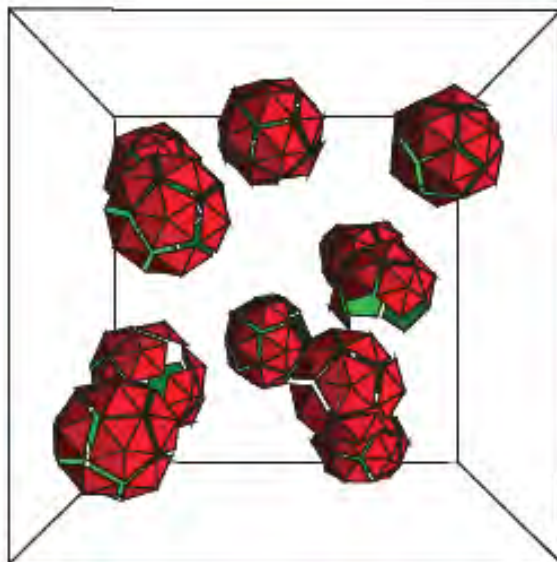


**Figura 12.** Estructura geométrica básica propuesta para los parvovirus. A partir de la unidad geométrica triangular puede obtenerse la estructura poliedral básica del virus.

Las funciones de las cápsides víricas requieren de una estructura dinámica. Por otra parte, la cápside necesita ser suficientemente estable para proteger el genoma cuando los viriones se mueven de célula a célula. Además deben tener la habilidad de cambiar su conformación para desensamblarse y liberar el genoma. Estudios de la cápside del virus HRV14 mostraron que existe una remarcable plasticidad de la cápside y que esto no es evidente en la estructura cristalina (Wang y Smith, 2005). En investigaciones realizadas del ensamble del virus de la hepatitis B (HBV), se ha observado una marcada histéresis entre asociación y disociación de cápsides. El ensamble *in vitro* de la cápside del virus HBV es consistente con las predicciones realizadas mediante el modelo de ensamble, ya que se encontró una cinética de ensamble sigmoideal y la presencia de intermediarios fue rara. Un modelo basado en el análisis de la cinética de ensamble indica que éste es nucleado por un trímero de Cp149<sub>2</sub>, lo cual es completamente compatible con la geometría del virus HBV. Para los estudios de estabilidad se han utilizado agentes caotrópicos como el cloruro de guanidinio y la urea que permiten inducir la disociación de las cápsides. El efecto de estos agentes es determinado por fluorescencia, DLS, SEC y dicróismo circular. Mediante estos estudios se encontró que la disociación de las cápsides del HBV presenta histéresis y puede ser reversible, pero esto es dependiente de la concentración de los agentes caotrópicos (Shing y Zlotnick, 2003).



Los modelos para virus describen el ensamble como una cascada de reacciones de bajo orden llevando a la formación de polímeros cerrados de tamaño específico (Shing y Zlotnick, 2003). Los primeros modelos fueron hechos por el grupo de Zlotnick *et al.*, (1994, 1999, 2000, 2003), quienes emplearon ecuaciones cinéticas para medir el flujo entre las poblaciones con diferentes tamaños de ensamble. Estos estudios cinéticos reproducen observaciones experimentales importantes como son la acumulación de monómeros (*starvation*) e histéresis y han mostrado que las bajas energías de asociación son suficientes para favorecer el ensamble de las cápsides (Johnston *et al.*, 2010). La figura 13 muestra la imagen de uno de los pasos en una simulación de dinámica molecular del ensamble de la cápside de un virus con número de triangulación  $T=1$ . Este tipo de estudios permitirían predecir las condiciones en que estas partículas son más o menos estables e indicaría el rumbo a seguir en la modificación de tales partículas con miras a sus posibles aplicaciones biomédicas y biotecnológicas.



**Figura 13.** Imagen de una dinámica molecular mostrando un 60% de rendimiento de cápsides. En este caso hay 11 clústeres debido a que un número de cápsides son sólo parcialmente formadas y no hay mas monómeros para alcanzar el ensamble completo (*the monomer starvation trap*) (Johnston *et al.*, 2010).



## 1.6. Factores que afectan el ensamble de las VLPs.

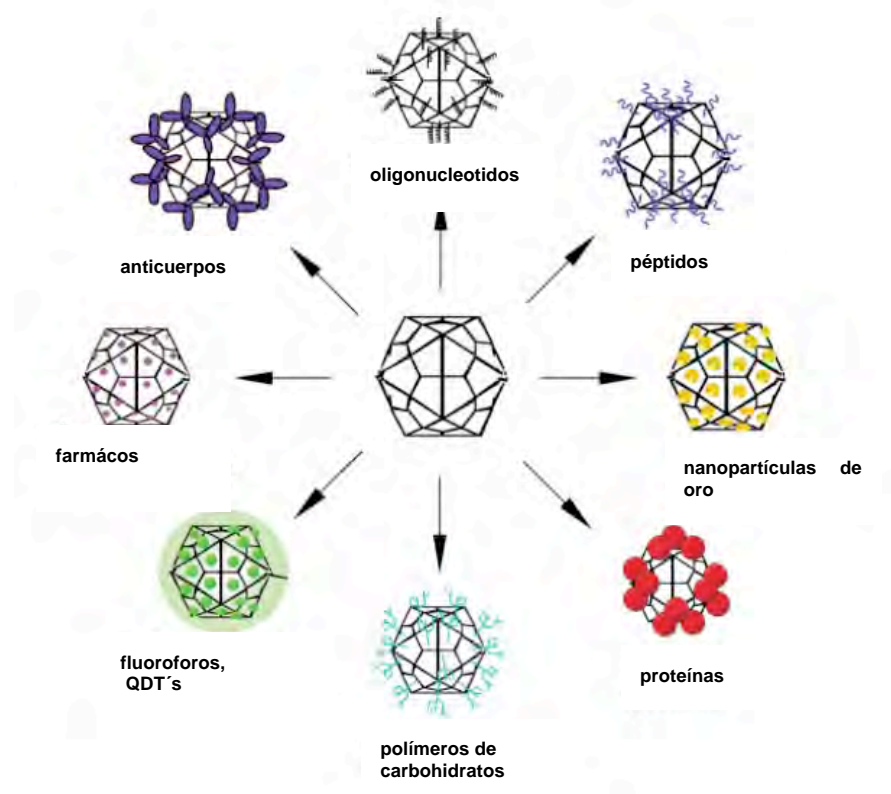
Las proteínas correspondientes a las cápsides virales se pueden recuperar por varios caminos dependiendo de sus propiedades, ya sea en forma monomérica y posteriormente ensamblarse en cápsides o aprovechar el autensamble de las partículas en el interior de las células para posteriormente separarlas del resto de las proteínas. Para el ensamble de las partículas virales *in vitro* es necesario estudiar y definir las condiciones específicas que permiten obtener buenos rendimientos. Se ha reportado que el ensamble puede estar controlado por diversos factores como son la fuerza iónica, el pH, la concentración de proteína y la presencia de agentes reductores, agentes quelantes, iones divalentes o de algún otro aditivo como el glicerol o la arginina. Por ejemplo el ensamble de las VLPs del poliomavirus (VP1) puede ser iniciado por la presencia de calcio y una alta fuerza iónica (Casini *et al.*, 2004). En otro estudio se ha demostrado que el ensamble del papilomavirus humano L1 (HPV L1) se inicia por la remoción de agentes reductores como el DTT, para así permitir la formación de puentes disulfuro entre capsómeros (Li *et al.*, 1998). Por el contrario, bajo ciertas condiciones se podría evitar el ensamble, como en el caso particular de la proteína VP1 del virus SV40, que permanece en forma de pentámeros a pH y fuerza iónica fisiológica, mientras que a pH 5 se ensambla en estructuras tubulares.

También se ha demostrado el ensamble de VLPs a partir de cuerpos de inclusión solubilizados en agentes desnaturizantes como la urea y el GuHCl. Ha sido reportado que muchos aditivos como la arginina, el glicerol y el NaCl podrían suprimir la agregación de las proteínas durante su renaturalización (Arakawa *et al.*, 2003; Umetsu *et al.*, 2003). Por ejemplo, bajo condiciones apropiadas, la proteína VP6 del rotavirus puede ser renaturalizada y autoensamblarse en VLPs sin provocar su agregación (Zhao *et al.*, 2011). En otro estudio, durante el desarrollo de quimeras del virus de la hepatitis B (HBc), se demostró que la proteína quimérica HBcAg forma cuerpos de inclusión y puede replegarse y autoensamblarse en VLPs a partir de una solución de urea 6 M. En este caso, para obtener un buen ensamble, la proteína fue replegada directamente en amortiguador Tris-HCl 100 mM, glutatión reducido 5 mM, glutatión oxidado 0.5 mM, L-arginina-HCl 400 mM, glicerol al 10% y urea 0.5 M a pH 8 (Zhang *et al.*, 2007).



## 1.7. Principales aplicaciones de las VLPs.

Las VLPs pueden ser usadas como vectores para transportar moléculas unidas químicamente a la superficie, o como base para el encapsulamiento y la liberación específica de moléculas con importancia farmacológica como son medicamentos, ARNs, ARNs, genes, nanopartículas magnéticas, *quantum dots* y otros dispositivos para imagen médica. La superficie de una gran variedad de VLPs ha sido funcionalizada con diversas moléculas, incluyendo vitaminas, azidas, carbohidratos, ácidos nucleicos, péptidos, proteínas, anticuerpos, partículas de oro y magnéticas, *quantum dots* y moléculas fluorescentes (Steinmetz *et al.*, 2006). Las modificaciones químicas y genéticas de la superficie de las VLPs les confiere propiedades únicas que pueden ser usadas para la incorporación y presentación de todas estas moléculas (Figura 14) (Fischelechner y Donath, 2007; Singh *et al.*, 2006).

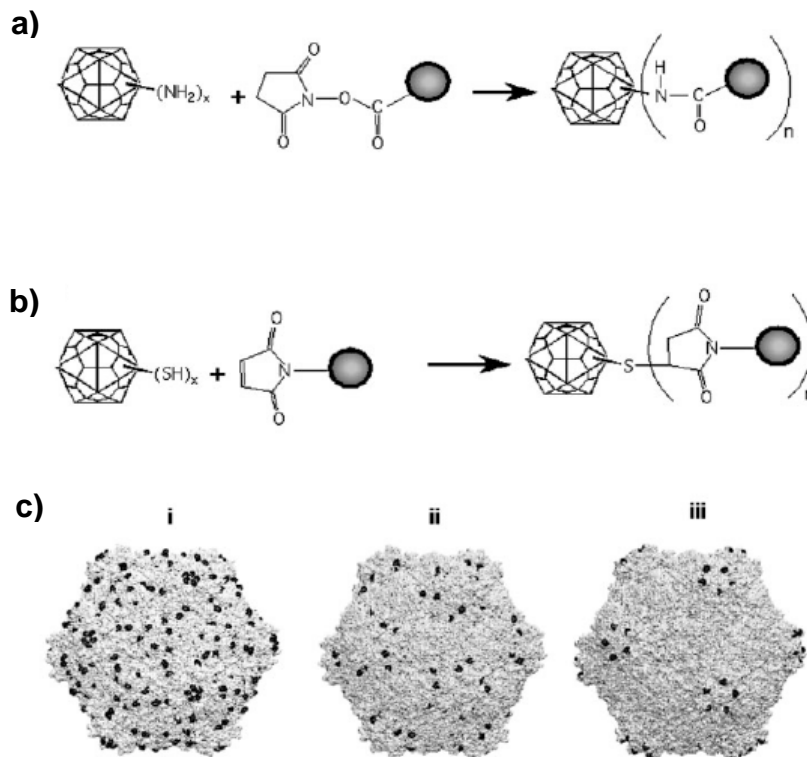


**Figura 14.** Aplicación de las VLPs en nanotecnología. Una gran variedad de ligandos tejido-específicos, o de otras moléculas pueden ser ligados o insertados genéticamente sobre su superficie (Singh *et al.*, 2006).



---

Los virus pueden presentar modificaciones químicas espacialmente distribuidas en la superficie, mediante el uso de varias técnicas que se encuentran disponibles para unir covalentemente diversas moléculas con proteínas (Fischlechner y Donath, 2007). La ventaja de usar virus, en lugar de nanopartículas artificiales, es el número definido y la orientación de grupos funcionales en su superficie, que además pueden presentar precisión nanométrica. Las lisinas, cisteínas o residuos de tirosina son comúnmente usados como sitios reactivos químicamente. También mediante manipulación genética se han creado mutantes con lisinas o cisteínas expuestas en las regiones accesibles de la cápside vírica para su posterior conjugación con moléculas químicas, tanto en el exterior como en el interior de la cápside (Figura 15). Es importante mencionar que este nivel de control no es posible con materiales inorgánicos o lípidos (Brown *et al.*, 2002; Ochoa *et al.*, 2006).



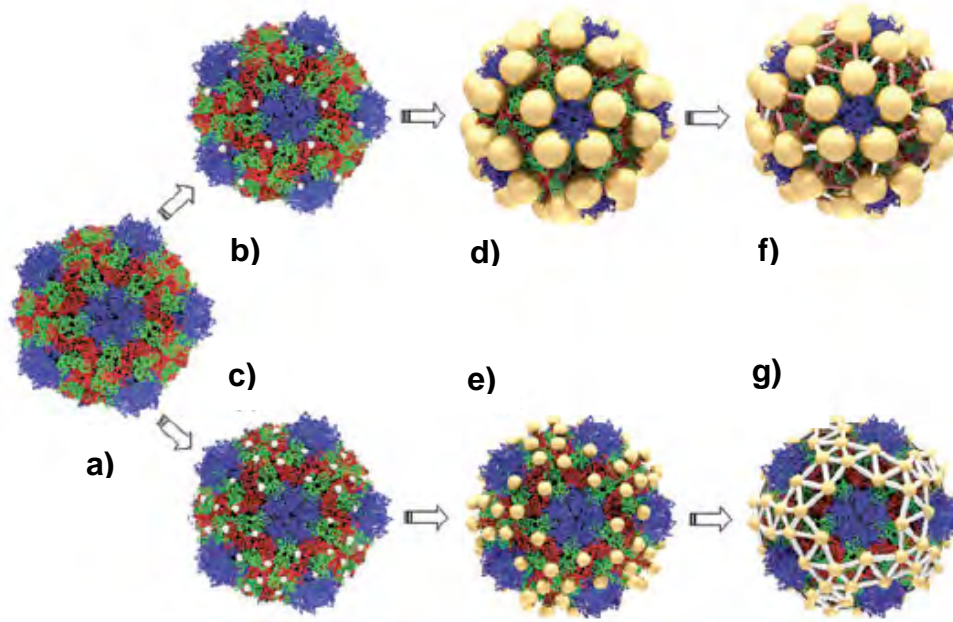
**Figura 15.** A) Las lisinas reaccionan con moléculas derivadas de  $\text{NH}_2$ -ésteres, B) Los grupos tiol de las cisteínas reaccionan con moléculas derivadas de maleamidas y C) Residuos accesibles para bioconjugación que pueden ser modificados genéticamente para que presenten una distribución mas ordenada. (Singh *et al.*, 2006).



Ésteres de *N*-hidroxisuccinimida (NHS) pueden ser conjugados a los residuos de lisinas, mientras que la maleimida, que es un agente reactivo para los grupos tioles, puede reaccionar con los residuos de cisteína (Singh *et al.*, 2006). Uno de los virus mejor caracterizados es el CPMV (virus del mosaico del frijol). Se ha reportado su modificación específica mediante interacción selectiva de las lisinas con fluoresceína, NH-ésteres, isotiocianato y biotina. El CPMV presenta un residuo de lisina en cada unidad asimétrica, dando un total de 60 residuos modificados por partícula (Wang *et al.*, 2002). Varios grupos de investigación han modificado genéticamente al CPMV para producir partículas con propiedades específicas (Blum *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2002). En su estado natural este virus no presenta cisteínas en su superficie, por lo que ha sido modificado genéticamente para que las presente en posiciones específicas y así insertar nanopartículas de oro (Figura 16). Estas partículas modificadas pueden llevar al desarrollo de interesantes dispositivos eléctricos con aplicación en catálisis redox, reconocimiento molecular, biosensores amperométricos y dispositivos nanoelectrónicos como son las baterías moleculares (Blum y *et al.*, 2005).

Recientemente las VLPs han recibido la atención como vehículos para la liberación de fármacos y para el desarrollo de vacunas. Los virus representan un sistema o vector natural, altamente especializado, para la transferencia de material genético. La VLPs homogéneas pueden ser una mejor alternativa tecnológica que algún tipo de nanopartícula amorfa para el desarrollo de agentes de liberación, ya sea de diagnóstico o terapéutico. La ventaja de una superficie regular es que los dominios de unión son funcionalmente idénticos debido a la equivalencia entre proteínas, permitiendo un mejor reconocimiento. Las cápsides generalmente tienen dominios de polipéptidos básicos orientados hacia el interior que presentan interacciones iónicas específicas con el material genético, ayudando a estabilizar su internalización. De esta misma manera, también podrían ser incorporadas diversas moléculas que presenten una carga apropiada, por ejemplo polímeros, proteínas, plásmidos y nanopartículas magnéticas. Altos rendimientos de re-ensamble serían importantes para un buen encapsulamiento y por lo tanto para la obtención de un buen rendimiento de partículas funcionalizadas.



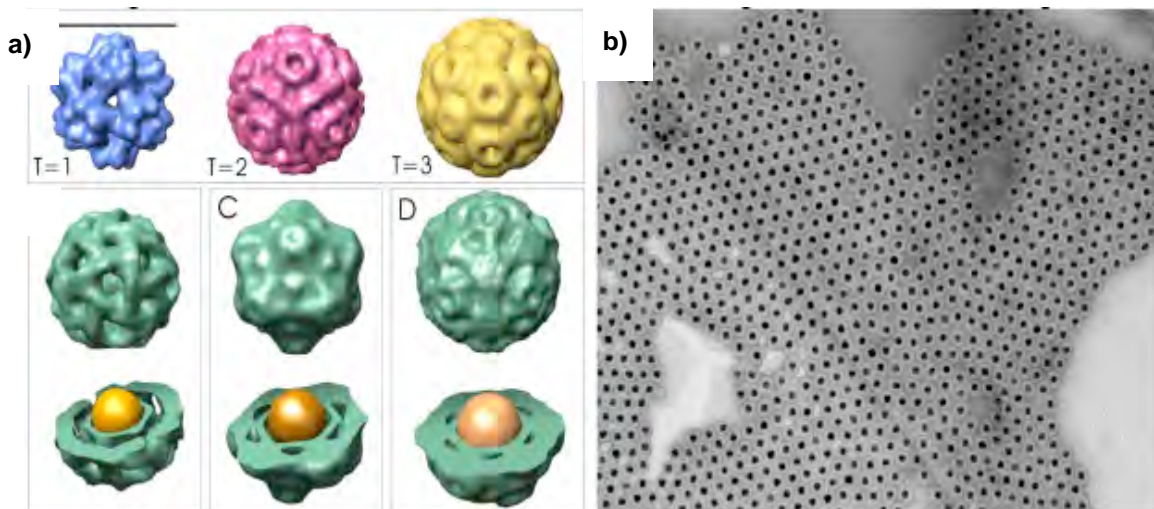


**Figura 16.** Esquema del procedimiento usado para crear conexiones moleculares sobre la superficie de la cápside del virus CPMV. a) Estructura cristalográfica de la cápside del virus CPMV; b) Mutante EF (con una cisteína por subunidad); c) Mutante DM (con dos cisteínas por subunidad); d) Mutante EF con nanopartículas de oro de 5 nm unidas a las cisteínas insertadas; e) Mutante DM con nanopartículas de oro de 2 nm unidas a las cisteínas insertadas; f) Mutante EF con las nanopartículas de oro de 5 nm interconectadas usando las moléculas di-Pt (rojo) y OPV (plateado); g) Mutantes DM con las nanopartículas de oro de 2 nm interconectadas con moléculas de OPV. (Blum *et al.*, 2005).

Muchos estudios se han enfocado en identificar los factores que podrían tener algún efecto durante el encapsulamiento. Se ha encontrado que el empaquetamiento de moléculas puede alterar el tamaño y morfología de las partículas, debido a cambios en las interacciones entre las proteínas estructurales. La interacción entre la molécula artificial a encapsular y las proteínas también puede afectar el autoensamble y la estabilidad de las estructuras resultantes, pero los mecanismos son muy poco conocidos y se requiere del entendimiento de cuáles son los parámetros relevantes que contribuyen a esta formación tan compleja (Sun *et al.*, 2006). Los principales factores que pueden afectar la eficiencia del ensamble de las VLPs incluyen a las propiedades físicas y químicas de la superficie de la molécula a encapsular. También se ha

---

observado que los poros de algunos virus pueden cambiar con el pH y este cambio estructural puede ser reversible, permitiendo un acceso programable al interior para el encapsulamiento. Un ejemplo de este mecanismo es el observado para el virus CCMV (virus del moteado clorótico del frijol) el cual puede incrementar hasta en un 10% su tamaño por un cambio de pH. La transición estructural del CCMV ha sido usada para la mineralización de paratungstato y decavanato en su interior. Otro ejemplo es el BMV (virus del mosaico en el género Bromus), que por debajo de pH 5 tiene un diámetro de 28 nm, y presenta un aumento de tamaño al incrementar el pH a 7, que puede ser reversible y sin disociación cuando hay  $Mg^{2+}$  presente. Considerando otro mecanismo diferente, también es posible la incorporación de moléculas en el interior de las cápsides mediante su disociación y su posterior re-ensamble en presencia de las moléculas a ser encapsuladas. El grupo de Dragnea estableció un protocolo para la incorporación de nanopartículas de oro, con diámetros entre 3 y 12 nm, en el interior de las cápsides del BMV (Figura 17). Por lo que uno de los principales cuestionamientos es fijar cuales son los requerimientos mínimos y que se deben satisfacer para promover el encapsulamiento sin interferir con sus mecanismos de acarreamiento (Aniagyei *et al.*, 2008).



**Figura 17.** a) Construcción tridimensional del virus BMV (virus del mosaico del género Bromus) y sus VLPs encapsulando nanopartículas de oro y b) micrografía obtenida por TEM mostrando un encapsulamiento eficiente de las nanopartículas de oro (Aniagyei *et al.*, 2008).



---

Existen diversos estudios en los que se ha demostrado que las VLPs se encuentran entre los materiales más importantes para el desarrollo de dispositivos de reconocimiento tejido-específico y de imagen *in vivo* (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2010). Por ejemplo, se ha reportado el desarrollo de VLPs del virus de la hepatitis B para la señalización de genes y liberación específica de medicamentos. Las proteínas L que conforman a este virus se unen de manera específica a los hepatocitos por lo que estas nanopartículas son efectivas para una señalización específica de células hepáticas cancerosas, por otro lado también mostraron ser útiles para empaquetar plásmidos o fármacos (Yamada *et al.*, 2003). En la Tabla del anexo 2 se presentan varias VLPs que han sido funcionalizadas para realizar estudios de reconocimiento celular.

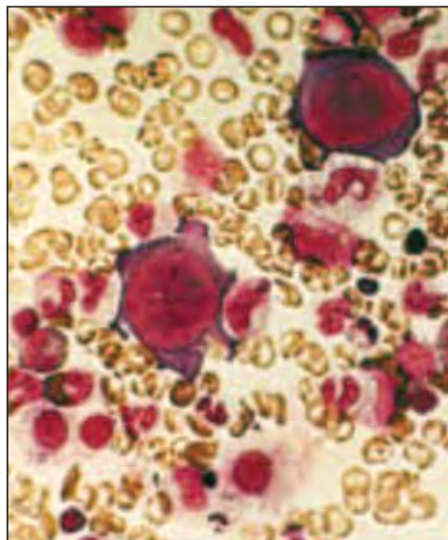
### **1.7. Parvovirus B19.**

Los parvovirus son agentes que causan diversas enfermedades en muchos mamíferos. El parvovirus B19 (PB19) fue descubierto casualmente en 1974 y fue en 1981, que Pattison lo asoció por primera vez a una enfermedad concreta, la crisis de anemia aplásica transitoria (CAT), al encontrar al antígeno B19 o anticuerpos IgM en sueros de pacientes con anemia de células falciformes. En 1985, tras realizar la inoculación experimental del virus en voluntarios sanos, Anderson demostró que el PB19 es el agente etiológico del eritema infeccioso (EI), megaloeitema epidémico o “quinta enfermedad” (Alexandrova y Shikova, 1999). En la actualidad, el espectro de cuadros clínicos en los que se implica al virus PB19 se ha ampliado, e incluye: hidropesía fetal no inmune, artritis, anemia crónica en pacientes inmunodeprimidos, eritroblastopenia transitoria de la infancia, púrpura vascular, púrpura trombocitopénica, hemofagocitosis, encefalitis, miocarditis, costochondritis, linfadenitis mesentérica, gastroenteritis aguda, pseudoapendicitis, vasculitis aguda, poliarteritis nudosa, queratolisis exfoliativa, bronquitis, laringitis, síndrome de distrés respiratorio (SDR), infecciones asintomáticas y otros (Heegard y Brown, 2002).

El PB19 pertenece a la familia Parvoviridae, género Erythrovirus, y posee una sola hebra de ADN de 5.5 kb, que contiene la información justa para replicarse,



empleando enzimas producidas durante la fase S del ciclo de la célula infectada. Este último hecho explica su tropismo por células con replicación activa. Tiene predilección por la serie eritroide, infectando e inhibiendo la actividad mitótica de eritroblastos (Figura 18). El PB19 no afecta células madre hematopoyéticas necesarias para la recuperación. Además de células eritroides, puede infectar miocitos cardiacos, leucocitos y otros tipos celulares (Aristi, 2002). El cultivo del PB19 es difícil y hasta ahora sólo se ha conseguido en tres líneas celulares: los megacariocitoblastoides UT7 y MB02, y la eritroleucémica JK1 (Heegard y Brown, 2002). Los sistemas de cultivo celular que son susceptibles a la infección por el PB19 no son adecuados o satisfactorios para su propagación a gran escala.



**Figura 18.** Eritroblastos circulantes con inclusiones intranucleares características del PB19.

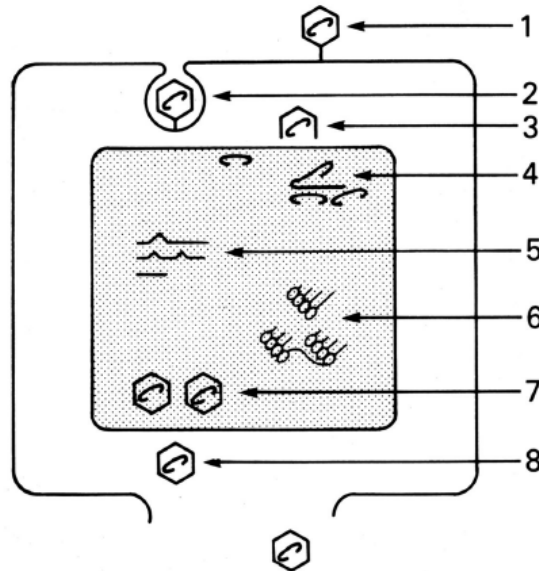
Las infecciones por este virus ocurren generalmente a finales del invierno y durante la primavera. El PB19 puede ser transmitido por vía respiratoria o por transfusiones de sangre infectada. Después de su replicación inicial, probablemente en el tracto respiratorio superior, hay un periodo de incubación de aproximadamente seis a ocho días, durante el cual ocurre viremia, excreción del PB19 por el tracto respiratorio y es cuando se presentan síntomas inespecíficos como fiebre o mialgia. Después, el PB19 infecta las células blanco que son fundamentalmente los precursores eritroides en



la médula ósea a través de su receptor, un globósido de membrana, que corresponde al antígeno del grupo sanguíneo P. De hecho, las escasas personas que no poseen este antígeno, no pueden ser infectadas. La replicación viral en estas células origina un “arresto” en la eritropoyesis normal (eritroblastopenia). La cuenta de reticulocitos desciende de manera dramática y hay una disminución temporal de la hemoglobina (aproximadamente 1 g/dL), aproximadamente por una semana. En este tiempo puede originar una crisis aplásica en enfermos bajo estrés eritropoyético (por ejemplo, anemia hemolítica crónica) (Brown *et al.*, 1997). La forma en que ocurre el daño a los eritroblastos aún no se conoce con certeza. Hay evidencia de daño citotóxico por la expresión de una proteína viral no estructural en la célula infectada. Otros estudios sugieren que la muerte de células eritroides se efectúa mediante apoptosis, pues han demostrado la expresión de la caspasa 3, así como de las proteínas p53 y p21, mediante inmunohistoquímica. Cabe señalar que estas hipótesis no se excluyen mutuamente. La forma de presentación depende, en gran medida, del estado inmunológico o hematológico del paciente, los grupos de alto riesgo comprenden enfermos con anemia hemolítica crónica, inmunodepresión o fetos (Aristi, 2002). Dos tipos de anticuerpos pueden ser producidos en respuesta a la infección por el parvovirus B19: IgM e IgG. Los anticuerpos IgM son los primeros en ser producidos por el cuerpo en respuesta a la infección, éstos se encuentran presentes en la mayoría de los individuos dentro de una semana o dos después del comienzo de la infección. En este tiempo los anticuerpos IgG no pueden ser detectados en el cuerpo, se ha identificado que son producidos algunas semanas después como mecanismo de defensa por largos periodos de tiempo. Una vez que una persona ha sido expuesta a este virus tendrá cierta cantidad de anticuerpos IgG en su sangre para el resto de su vida.

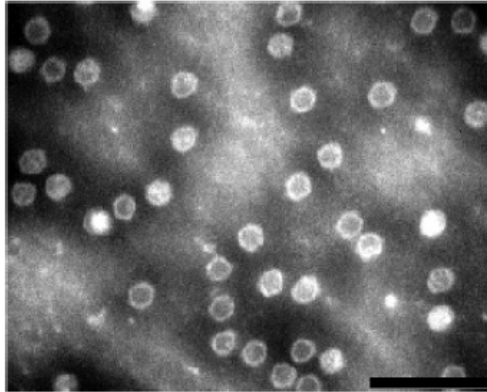
El ciclo de vida del PB19, es muy similar al de otros virus no envueltos que contienen ADN en su genoma. La replicación del virus comienza con su unión a los receptores de la célula hospedera y posterior internalización, translocación del genoma al núcleo de la célula hospedera, replicación del ADN, transcripción del ARN, ensamble de las cápsides, empaquetamiento del genoma, y finalmente la lisis celular para la liberación de los viriones maduros (Figura 19).





**Figura 19.** Representación esquemática del ciclo de vida del Parvovirus B19. 1) Unión al antígeno P del eritrocito grupo sanguíneo (globósido), éste se expresa sobre los eritrocitos maduros, precursores eritroides, megacariocitos, células endoteliales, placenta e hígado y corazón fetal. 2) Penetración por endocitosis, 3) Desensamble y translocación del ADN viral al núcleo, 4) Replicación del ADN, 5) Transcripción del ARN, 6) Traducción de las proteínas, 7) Ensamble de los viriones, 8) Liberación del virus por lisis celular (Heegard y Brown; 2002).

El PB19 es un virus no envuelto con un diámetro aproximado de 22 a 26 nm y presenta una simetría icosaédrica (Figura 20). La cápside consiste de 60 subunidades en donde se encuentra empacado su DNA genómico que codifica para tres proteínas diferentes: dos proteínas estructurales (VP1 y VP2) que son codificadas por marcos de lectura traslapados y una proteína no estructural (NS1). La proteína VP2 conforma un 96% del total de las proteínas de la cápside y tiene un peso molecular de 58 kDa. La proteína VP1 es idéntica a la proteína VP2, pero con la adición de 227 aminoácidos en la región amino terminal, tiene un peso molecular de 84 kDa y representa el 4% remanente del total de las proteínas de la cápside (Kaufmann *et al.*, 2004; Heegard y Brown, 2002). El contenido limitado de ADN y la ausencia de una envoltura lipídica hacen que el PB19 sea extremadamente resistente a la inactivación térmica. El virus es estable a 56°C por 60 min y también es estable en disolventes orgánicos, provocando que sea ideal su uso en varios métodos de bioconjugación y en aplicaciones nanotecnológicas.



**Figura 20.** Micrografía mostrando partículas virales del PB19 a una magnificación de X 250,000. La barra corresponde a 100 nm, (Heegard y Brown, 2002).

### 1.8. VLPs del Parvovirus B19.

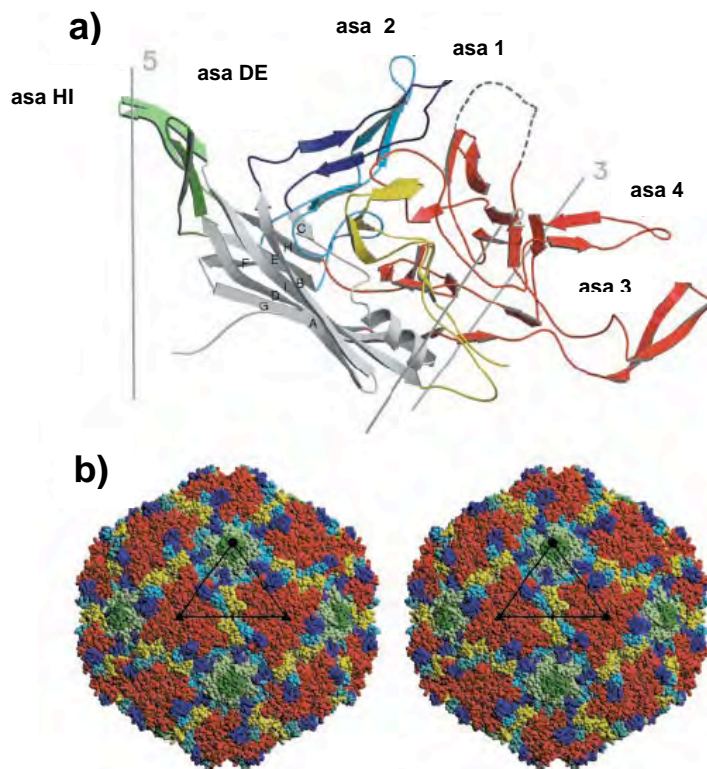
En los últimos años las VLPs recombinantes del PB19 han ganado importancia, principalmente para el desarrollo de vacunas, para estudios de reconocimiento celular y ensayos de diagnóstico (Kajigaya *et al.*, 1991, Casal, 1999, 2001; Enders *et al.*, 2007). Hasta ahora se ha demostrado la formación de VLPs utilizando diversos sistemas de expresión y se han propuesto diferentes estrategias para su producción (Tabla 2).

**Tabla 2.** Estudios reportados relacionados con la producción de VLPs del PB19.

Estudio	Observaciones	Referencias
Expresión de las proteínas VP1/VP2 en baculovirus	Es factible su uso para la producción de vacunas. Es necesaria la presencia de las dos proteínas para la inducción de los anticuerpos en el huésped.	Bansal <i>et al.</i> , 1991; Sico <i>et al.</i> , 1994
Expresión de la proteína VP2 en baculovirus	Las VLPs presentaron la misma antigenicidad y morfología que los viriones nativos.	Kajigaya <i>et al.</i> , 1991; Wong <i>et al.</i> , 1994
Expresión de la proteína VP2 en <i>Sacharomyces</i>	Este sistema fue factible para producir altas cantidades de partículas solubles, con tamaño y antigenicidad similar a las partículas generadas en baculovirus.	Lowin <i>et al.</i> , 2005
Producción de VLPs PB19-VP2 fluorescentes en baculovirus	Se obtuvieron VLPs fluorescentes que podrían ayudar a elucidar el mecanismo de infección y patogénesis de este virus.	Gilbert <i>et al.</i> , 2005
Expresión de VP2 en <i>E. coli</i>	Se logró la expresión de la proteína VP2, presentando potencial como antígenos, pero no se reportó el ensamble de VLPs.	Lee <i>et al.</i> , 1999
Introducción de una etiqueta de histidinas en el extremo NH <sub>2</sub> -terminal de la proteína VP1 y VP2, para su expresión en baculovirus	Se obtuvieron VLPs a partir de la proteína VP2 fusionada a la etiqueta de histidinas. Ambas proteínas se pudieron purificar por cromatografía de afinidad. Ambas proteínas tienen un alto potencial como antígenos para el diagnóstico de la infección por PB19.	Michel <i>et al.</i> , 2008
Producción de PB19 VLPs quimeras presentando el antígeno protector (PA) de <i>Bacillus anthracis</i>	Se obtuvieron VLPs quimeras con capacidad de retener la inmunogenicidad del epítopo (PA).	Ogasawara <i>et al.</i> , 2006
Producción de PB19 VLPs quimeras presentando 2 epítopos del virus del dengue	Se obtuvieron VLPs que presentaron una fuerte respuesta inmunológica para estos epítopos al hacer estudios en ratones.	Amexis y Young, 2006



Las proteínas VP1 y VP2, juntas y por separado, han sido expresadas en células de mamíferos y en sistemas de expresión de baculovirus. Se ha demostrado que las proteínas recombinantes VP1 y VP2 son capaces de autensamblarse en cápsides vacías cuando son expresadas simultáneamente en el sistema baculovirus (Wong *et al.*, 1994; Gilbert *et al.*, 2004). Las cápsides que consisten únicamente de proteína VP2 tienen una apariencia idéntica a las cápsides recombinantes que contienen ambas proteínas y también a las de los virus nativos. A estas partículas se les ha podido determinar su estructura mediante cristalografía de rayos X a una resolución de 3.5 Å de resolución (Figura 21).



**Figura 21.** Estructura secundaria del Parvovirus B19. a) Diagrama de listón de la proteína VP2. Las hojas del barril  $\beta$  (gris), se encuentran marcadas secuencialmente de A a I. Las asas de la superficie que conectan al barril  $\beta$  se encuentran codificadas por color: azul oscuro, asa BC; verde oscuro, asa DE; azul claro, asa EF; rojo, asa GH; verde claro, asa HI; amarillo, aminoácidos en el extremo C-terminal. La posición del asa desordenada (línea punteada, aminoácidos 301-313), se modeló de acuerdo al asa que está en la misma posición en el virus AAV-2. b) Topografía de la superficie del PB19-VP2. (Kaufmann *et al.*, 2004).





---

A partir de este estudio se sabe que la proteína VP2 presenta un motivo estructural de 8 hojas  $\beta$  antiparalelas que es muy común en muchas otras proteínas que conforman la cápside de otros virus (Kaufman *et al.*, 2004). También se sabe que la proteína VP1 no puede autoensamblarse para formar cápsides y también se ha demostrado que no se requiere para el ensamble de las cápsides. La capacidad de desarrollar VLPs con características similares a los virus nativos a partir de una sola proteína, hace muy atractivo su uso como herramienta para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas y biomédicas.

Son muy pocos los estudios en los que se ha realizado la expresión de las proteínas del Parvovirus B19 en bacterias y los ensayos basados en estos productos han sido imperfectos ya que no se lograron identificar anticuerpos IgM y también se demostró una pérdida general de especificidad y sensibilidad de las partículas obtenidas (Kajigaya *et al.*, 1991).



---

## 2. JUSTIFICACIÓN

El parvovirus B19 es un modelo interesante para estudios de nanotecnología y biomedicina debido a sus propiedades: 1) Se pueden formar VLPs con una sola proteína (VP2); 2) Esta proteína puede ser modificada en su extremo N-terminal sin perder su potencial para formar cápsides, a diferencia de lo que ocurre con la proteína VP1. Esta propiedad nos podría facilitar su direccionamiento a distintos tejidos o bien la introducción de dominios proteicos con propiedades de unión o catalíticas de interés; 3) Su potencial de aplicación en medicina es enorme, ya que es un virus que infecta a humanos por lo que cuenta con células blanco preexistentes; 4) Se puede aprovechar que, de acuerdo a su ciclo de infección, este virus llega intacto hasta su interacción con el núcleo de la célula que infecta, por lo que sería muy factible su uso para la liberación específica de material genético como ARNs o plásmidos; 4) Dada su relativa sencillez estructural (*e.g.* no tiene envoltura y sólo está compuesto de un tipo de proteína), es un sistema ideal para desarrollar modelos de asociación de capsómeros. En este proyecto proponemos estudiar las condiciones que promueven o afectan el ensamblado y desensamblado *in vitro* de las cápsides vacías del parvovirus B19 generadas a partir de la proteína VP2 recombinante.

## 3. HIPÓTESIS

La expresión de algunas proteínas de origen viral en *E. coli* puede llevar a la formación de cuerpos de inclusión. Esto ha sido encontrado para la proteína VP2 del PB19. Mediante la manipulación de diversas condiciones fisicoquímicas (pH, fuerza iónica, temperatura, presencia de arginina) será posible llevar a cabo el ensamble de las partículas virales completamente *in vitro*, partiendo de la proteína VP2 solubilizada y desnaturalizada en GuHCl. La estabilidad de las VLPs producidas también dependerá de diversos factores (temperatura, presencia de detergentes, urea, GuHCl y arginina) (Anexo 3).

---

---

## 4. OBJETIVOS

### Objetivo General

Estudiar las condiciones que promueven o inhiben el ensamblado y desensamblado de las VLPs del parvovirus B19 *in vitro*, producidas a partir de la proteína VP2 recombinante expresada en *Escherichia coli*.

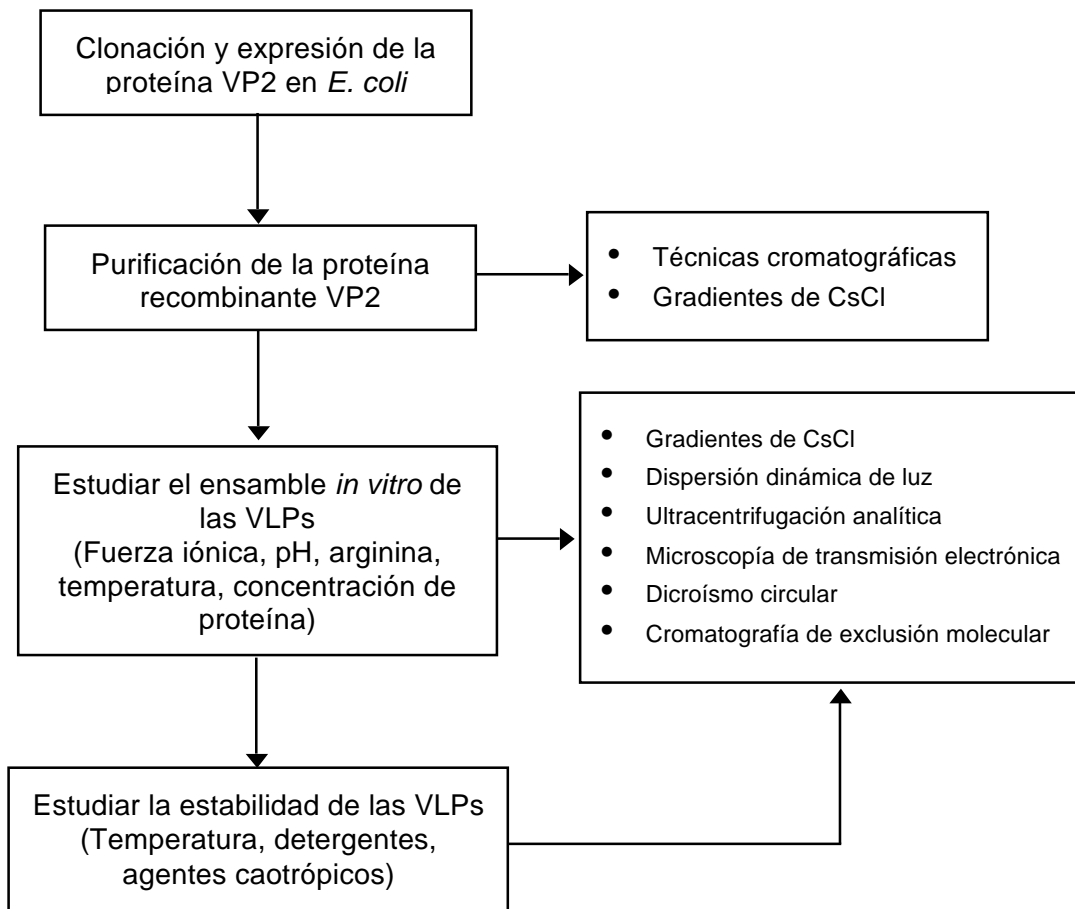
### Objetivos Particulares

- Clonar y expresar la proteína VP2 en *Escherichia coli*.
- Estandarizar la metodología para la purificación de la proteína VP2.
- Estudiar e identificar las mejores condiciones de ensamble *in vitro* para las VLPs del PB19 por variación de pH, fuerza iónica, temperatura y agentes caotrópicos.
- Estudiar la estabilidad de las VLPs, en función de la temperatura, detergentes y agentes caotrópicos.
- Estudiar el efecto de la arginina en el ensamble y estabilidad de las VLPs.

---

---

## 5. METODOLOGÍA



**Figura 22.** Esquema general del procedimiento experimental.



---

## **5.1. Recuperación y purificación de la proteína VP2.**

### **5.1.1. Clonación del gen *vp2* en el vector pET22b(+).**

El gen VP2 fue sintetizado químicamente (Epoch Life Science) tomando en cuenta los codones necesarios para la expresión de la proteína en *E. coli*. La secuencia que codifica para la proteína VP2 se obtuvo clonada en el vector BluescriptII(+/-). Este plásmido se utilizó para transformar células de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Las bacterias transformadas se seleccionaron en agar LB con ampicilina a 50  $\mu$ g/mL (Medio LB amp). Se purificó el plásmido y se cortó con las enzimas *Nde*I y *Eco*RI, el fragmento obtenido se separó y purificó de un gel de agarosa al 1%. Posteriormente el gen *vp2* se insertó dentro de los sitios *Nde*I y *Eco*RI del plásmido pET22b<sup>+</sup> (Novagen) (Anexo 4). El gen se ligó al vector con ligasa de T4 (New England Biolabs), siguiendo las instrucciones del fabricante. Con el producto de la ligación, (vector pETVP2) se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ , y se seleccionaron algunas colonias para purificar el plásmido, volver a digerir e identificar en un gel de agarosa al 1% las bandas correspondientes a cada uno de los fragmentos (vector pET y gen *vp2*). Aquellos plásmidos que presentaron el patrón de restricción correcto se secuenciaron para verificar la presencia del gen *vp2*. Después de verificar que el plásmido pETVP2 contiene el inserto, se procedió a transformar células de *E. coli* BL21 (DE3).

### **5.1.2. Expresión de la proteína VP2 en *Escherichia coli*.**

#### **5.1.2.1. Efecto de la concentración de IPTG y del tiempo de inducción.**

Primero se estudió la expresión de la proteína VP2 en función de la concentración de isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG). La cepa de *E. coli* transformada con el plásmido pETVP2 fue inoculada en un tubo con 10 mL de medio LB amp que se dejó incubando toda la noche a 37°C. Posteriormente con este medio se inocularon 11 tubos con 10 mL de medio LB amp que se dejaron incubando durante 3 h a 37°C. Después de este tiempo a cada uno se le adicionó una concentración diferente de IPTG (0-1 mM). Después de 3 h de inducción se tomó una muestra de cada tubo y se analizó por SDS-PAGE. Para estudiar la inducción en función del tiempo, se inoculó un tubo con 10 mL



---

de medio LB amp y después de 3 h de incubación se le adicionó 0.25 mM de IPTG. Se tomaron muestras cada hora durante 3 h y también se analizaron por SDS-PAGE.

### **5.1.3. Identificación de cuerpos de inclusión.**

La cepa de *E. coli* transformada con el plásmido pETVP2 fue inoculada en un tubo con 10 mL de medio LB amp que se dejó incubando toda la noche a 37°C. Posteriormente con este medio se inocularon 2 tubos con 10 mL de medio LB amp y después de 3 h de incubación a uno se le adicionó 0.25 mM de IPTG, el otro tubo se utilizó como control negativo. Después de 3 h de incubación se tomaron muestras de 500 µL y se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min. Las células se resuspendieron en 100 µL de agua, posteriormente se sonicaron durante 1 min y se volvieron a centrifugar. Se corrió una electroforesis de las células completas, del sobrenadante y del pellet, para así confirmar si la proteína se expresa de forma soluble o insoluble.

### **5.1.4. Expresión de la proteína VP2.**

La cepa de *E. coli* transformada con el plásmido pETVP2 fue inoculada en un tubo con 10 mL de medio LB amp que se dejó incubando toda la noche a 37°C y 250 rpm. Con este tubo se resembró un matraz con 100 mL de medio LB amp que se dejó incubando durante 4 h. Con este matraz se resembró un matraz con 1 L de medio LB amp que se dejó incubando durante 4 h, al término de este tiempo se adicionaron 0.25 mM de IPTG. La inducción de la proteína se realizó durante toda la noche (entre 14 y 16 h) a 37°C.

### **5.1.5. Purificación de la proteína VP2.**

Se estudiaron diversas técnicas y condiciones para la purificación de la proteína VP2, a continuación se presenta la metodología con la que se obtuvo una mayor pureza y mayor rendimiento de proteína. Esta metodología se divide en 4 etapas: 1) Lisis de células y recuperación de los cuerpos de inclusión, 2) Limpieza de los cuerpos de inclusión, 3) Solubilización de los cuerpos de inclusión y 4) Cromatografía de exclusión molecular en condiciones desnaturizantes (Anexo 5).





---

#### **5.1.5.1. Lisis de las células y recuperación de los cuerpos de inclusión.**

Las células obtenidas de 1L de medio de cultivo se resuspendieron en 100 mL de amortiguador A (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, NaCl 0.15 M, urea 8 M, pH 8). La muestra se sonicó durante 3 min y se dejó en agitación durante 1 h a 37°C. Posteriormente el pellet con los cuerpos de inclusión fue recuperado mediante centrifugación a 8000 rpm durante 15 min.

#### **5.1.5.2. Lavado de los cuerpos de inclusión.**

El pellet recuperado, después de la lisis de las células con urea 8 M, fue resuspendido en 40 mL de amortiguador Tris-HCl 50 mM con pH 8, y fue sonicado por 1 min. Posteriormente la muestra fue centrifugada a 8,000 rpm durante 10 min. Se desechó el sobrenadante y el pellet recuperado se resuspendió en 40 mL de amortiguador de lavado (Tris-HCl 50 mM, urea 3 M, Tritón al 2%; pH 8) para posteriormente volver a sonicar y centrifugar, bajo las mismas condiciones. Siguiendo el mismo procedimiento, se realizaron dos lavados más con el amortiguador de lavado y posteriormente dos lavados con el mismo amortiguador pero con 5 M de urea. Por último se realizaron dos lavados con amortiguador Tris-HCl 50 mM con pH 8, para así eliminar el detergente y la urea de las muestras.


#### **5.1.5.3. Solubilización de cuerpos de inclusión.**

Después de los lavados, el pellet fue resuspendido en 100 mL de amortiguador B (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 5 mM, NaCl 0.15 M, y GuHCl 6 M; pH 8). La muestra se dejó en agitación durante 24 h a 37°C, para así obtener una solubilización completa de los cuerpos de inclusión. Posteriormente la muestra fue concentrada 10 veces mediante cartuchos de ultrafiltración (Amicon, YM-100).

#### **5.1.5.4. Purificación de la proteína VP2 mediante filtración en gel en condiciones desnaturizantes.**

Los cuerpos de inclusión solubilizados y concentrados fueron separados en 3 lotes para realizar filtración en gel en condiciones desnaturizantes. Se utilizó una columna

---

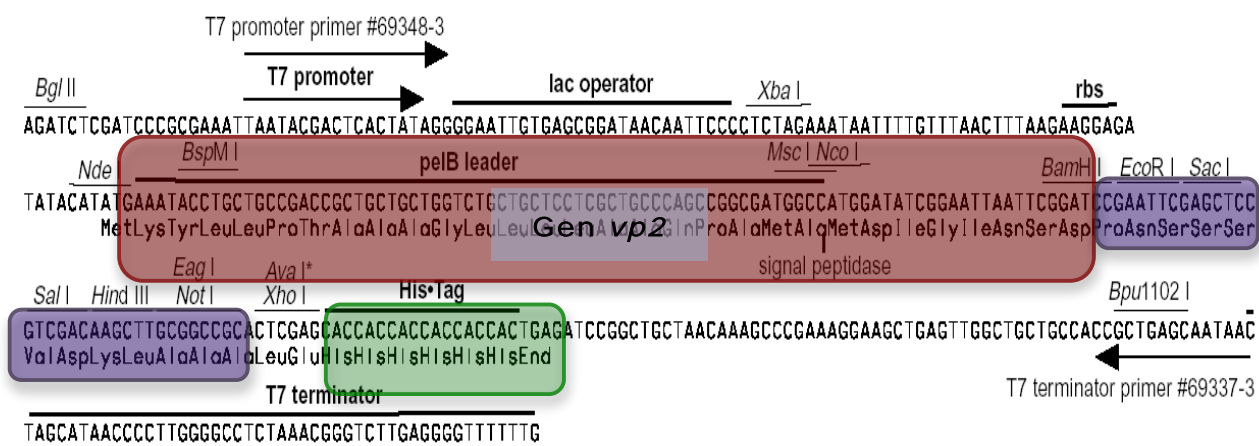


superdex 200 XK16/100 pre-equilibrada con amortiguador B. Se utilizó un flujo de 0.2 mL/min y se colectaron fracciones de 1 mL. La pureza de las fracciones obtenidas fue verificada mediante SDS-PAGE. Para poder correr las muestras en la electroforesis, fue necesario eliminar el cloruro de guanidinio de cada una de las fracciones mediante diálisis. Las fracciones que contenían a la proteína VP2 y que presentaban una mejor pureza, se separaron en dos lotes, uno que corresponde a la proteína VP2 más las impurezas de menor peso molecular y el otro lote a la proteína VP2 mas las impurezas de mayor peso molecular (en ambos casos se juntaron las fracciones obtenidas de los 3 lotes iniciales). Se volvió a realizar filtración en gel a cada uno de los dos lotes. Se juntaron las fracciones de las dos corridas en las que la proteína presentó una mayor pureza y se confirmó la pureza del lote final por SDS-PAGE. La cantidad de proteína se determinó siguiendo la absorbancia a 280 nm, ya que el GuHCl interfiere con técnicas como BCA y Bradford. Se utilizó una curva patrón de albúmina, solubilizada en el amortiguador B. El porcentaje de aminoácidos aromáticos en nuestra proteína y en la albúmina no correlaciona del todo (VP2: 1.64% de triptófanos y 3.79% de tirosina y para BSA: 0.34% y 3.6%, respectivamente). Siguiendo esta metodología se podría sobreestimar la concentración de proteína en la muestra, pero nos permite tener una estimación que posteriormente se puede correlacionar con la concentración real si se determina el coeficiente de extinción molar para VP2. Para posteriores experimentos también se confirmó que existiera una correlación entre la determinación de proteína por absorbancia a 280 nm y BCA.

#### **5.1.6. Inclusión de una etiqueta de histidinas en el extremo C-terminal de la proteína VP2.**

Con el objetivo de obtener mayores rendimientos de proteína VP2 y simplificar su purificación, se insertó una etiqueta de histidinas en el extremo C-terminal. Se utilizó como templado el plásmido pETVP2, ya que presenta un fragmento que codifica para una etiqueta de 6 histidinas (Figura 23). Para poder unir al gen *vp2* con la secuencia que codifica para la etiqueta de histidinas se mandaron sintetizar los siguientes cebadores: 1) Forward 5'-TAAGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGC-3' y 2) Reverse 5'-GAATTCCTCGAGAGGGTGGACACG-3'. Este último cebador se interna en la secuencia del gen *vp2*, además hacia su propio extremo 5' presenta el sitio de restricción *XhoI*. Se estandarizaron las condiciones para la amplificación del plásmido

pETVP2 por PCR (Figura 24), usando un Termociclador PTC-200 (MJ Research). El producto de PCR está flanqueado por dos sitios de restricción *Xho*I, el que naturalmente se encuentra en el vector en la dirección 3' y que es amplificado por el primer forward, y el introducido por el primer reverse. El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa al 1% y fue purificado empleando el kit QIAprep Miniprep (QIAGEN). El producto fue cortado con la enzima de restricción *Xho*I, y posteriormente ligado consigo mismo utilizando la ligasa T4. El producto de ligación, denominado en lo sucesivo pETVP2His, se utilizó para transformar células de *E. coli* DH5 $\alpha$  y posteriormente células de *E. coli* BL21 (DE3).



**Figura 23.** Región de clonación del plásmido pET22b(+). Se puede observar la zona en la que queda insertado el gen de la proteína VP2. Los primers que se diseñaron permiten eliminar el fragmento marcado en morado, para que al final el gen *vp2* quede unido a la etiqueta de histidinas.

Componente	Volumen	Proceso	Ciclos	Temperatura °C	Tiempo (min)
Amortiguador (10x) (Mg <sup>2+</sup> )	5 $\mu$ L	Desnaturalización	1	94	3
Molde pETVP2	1 $\mu$ L	Desnaturalización	30	94	1
Cebador F	1 $\mu$ L	Hibridación	30	65	1
Cebador R	1 $\mu$ L	Extensión	30	68	15
Oligos	1 $\mu$ L	Extensión final		68	25
Pfu polimerasa	5 $\mu$ L				
H <sub>2</sub> O					

**Figura 24.** Condiciones utilizadas para la amplificación del plásmido pETVP2 y la construcción del plásmido pETVP2His.



---

### **5.1.7. Expresión de la proteína VP2-His en *E. coli*.**

Se siguió la misma metodología que en el apartado 5.1.2.1 y 5.1.3., para estudiar la expresión, el efecto de la concentración del IPTG y la formación de cuerpos de inclusión con la proteína VP2-His,

### **5.1.8. Escalamiento de la expresión de la proteína VP2-His.**

La cepa de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con el plásmido pETVP2His fue inoculada en un tubo con 10 mL de medio LB amp y se dejó incubando toda la noche a 37°C y 250 rpm. Con este tubo se inoculó un matraz de 500 mL de capacidad con 100 mL de medio LB amp que se dejó incubando durante 4 h a las mismas condiciones. Posteriormente con este matraz se inoculó un matraz de 2 L de capacidad con 1 L de medio LB amp, que se dejó incubando durante 4 h y posteriormente se le adicionó IPTG a una concentración final de 0.1 mM. El matraz se incubó durante 36 h a una temperatura entre 22-25°C y 125 rpm.

### **5.1.9. Purificación de la proteína VP2-His.**

La purificación de la proteína VP2-His se estandarizó para 2 L de medio de cultivo. Después de la inducción las células se centrifugaron a 8000 rpm durante 20 min y el pellet se resuspendió en 40 mL de amortiguador de lisis ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, 0.3 M de NaCl; pH 6.3). Las células se lisaron mediante sonicación (Ultrasonic Processor, 500 watt) utilizando pulsos de 9.5 s con pausas de 5 s durante 15 min en un baño de hielo. Después de la lisis, la muestra se centrifugó a 8000 rpm durante 20 min a 4°C. La proteína VP2-His también formó cuerpos de inclusión, esto es muy común durante la expresión de proteínas virales en sistemas heterólogos procariontes (Eshagui *et al.*, 2005; Das *et al.*, 2007; Klikova *et al.*, 1995). El pellet con los cuerpos de inclusión fue resuspendido en 40 mL de amortiguador de lisis. En este caso la purificación se dividió en tres etapas: 1) Limpieza de cuerpos de inclusión, 2) Solubilización de los cuerpos de inclusión y 3) Purificación de la proteína VP2-His por cromatografía de afinidad en condiciones desnaturalizantes.



---

### **5.1.9.1. Limpieza de cuerpos de inclusión.**

Se realizaron varios lavados de los cuerpos de inclusión con el fin de incrementar la pureza de la proteína. El pellet resuspendido en amortiguador de lisis fue sonificado durante 40 s y posteriormente centrifugado a 8000 rpm durante 10 min. El pellet se resuspendió en 40 mL de amortiguador de lavado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 0.3 M, urea 3 M, Tritón X-100 al 2%; pH 6.3), se volvió a sonificar durante 40 s y a centrifugar a 8000 rpm durante 10 min. Este lavado se repitió 2 veces y posteriormente se realizó otro con el mismo amortiguador, pero adicionado con 3 mM de DTT. Para el último lavado se utilizó amortiguador de lisis, con el objetivo de eliminar el exceso de urea, detergente y de agente reductor en la muestra. El pellet se recuperó por centrifugación a 8000 rpm durante 10 min.


### **5.1.9.2. Solubilización de cuerpos de inclusión.**

El pellet recuperado después de los lavados fue solubilizado con 80 mL de amortiguador de solubilización ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 0.3 M, DTT 2 mM, GuHCl 6 M; pH 6.3). La muestra se sonificó por 3 min y posteriormente se dejó en agitación a 180 rpm durante 24 h a 37°C. Los agregados de proteína que no se alcanzaron a solubilizar fueron eliminados por centrifugación a 13000 rpm durante 30 min y por último por microfiltración con membranas de 0.22  $\mu\text{m}$ .

### **5.1.9.3. Purificación final mediante cromatografía de afinidad.**

La purificación de la proteína VP2-His se realizó mediante cromatografía de afinidad en condiciones desnaturalizantes. Se utilizó una columna empacada con 20 mL de resina protino Ni-TED (Macherey Nagel), pre-equilibrada con el amortiguador de solubilización, pero sin la presencia de DTT. Se corrieron muestras de 25 mL a un flujo de 2 mL/min. Después de pasar la muestra, la columna fue lavada con 30 mL amortiguador de solubilización sin DTT y con 30 mL del mismo amortiguador, pero adicionado con imidazol 20 mM. La proteína se eluyó con 30 mL de amortiguador de elución ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, 0.3 M NaCl, GuHCl 6 M, Imidazol 500 mM; pH 6.3). Se colectaron fracciones de 5 mL y alícuotas de 80  $\mu\text{L}$  de cada fracción fueron dializadas y analizadas por SDS-

---



PAGE. Las fracciones que contenían a la proteína pura fueron colectadas y concentradas con cartuchos de ultrafiltración con tamaño de corte de 50 kDa (Millipore). Este paso también se aprovechó para eliminar el imidazol y para cambiar el amortiguador de solubilización por amortiguador de replegamiento (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0.15 M, EDTA 1 mM, 1 mM de DTT, GuHCl 5 M, pH 8). La concentración final de proteína, se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm. Se utilizó una curva patrón de albúmina solubilizada en el amortiguador de replegamiento. La pureza de la proteína fue determinada por análisis densitométrico con el software ImageJ (Burger and Burge, 2008). La concentración de proteína fue ajustada a 2 mg/mL y la muestra se almacenó a temperatura ambiente, hasta su posterior uso.

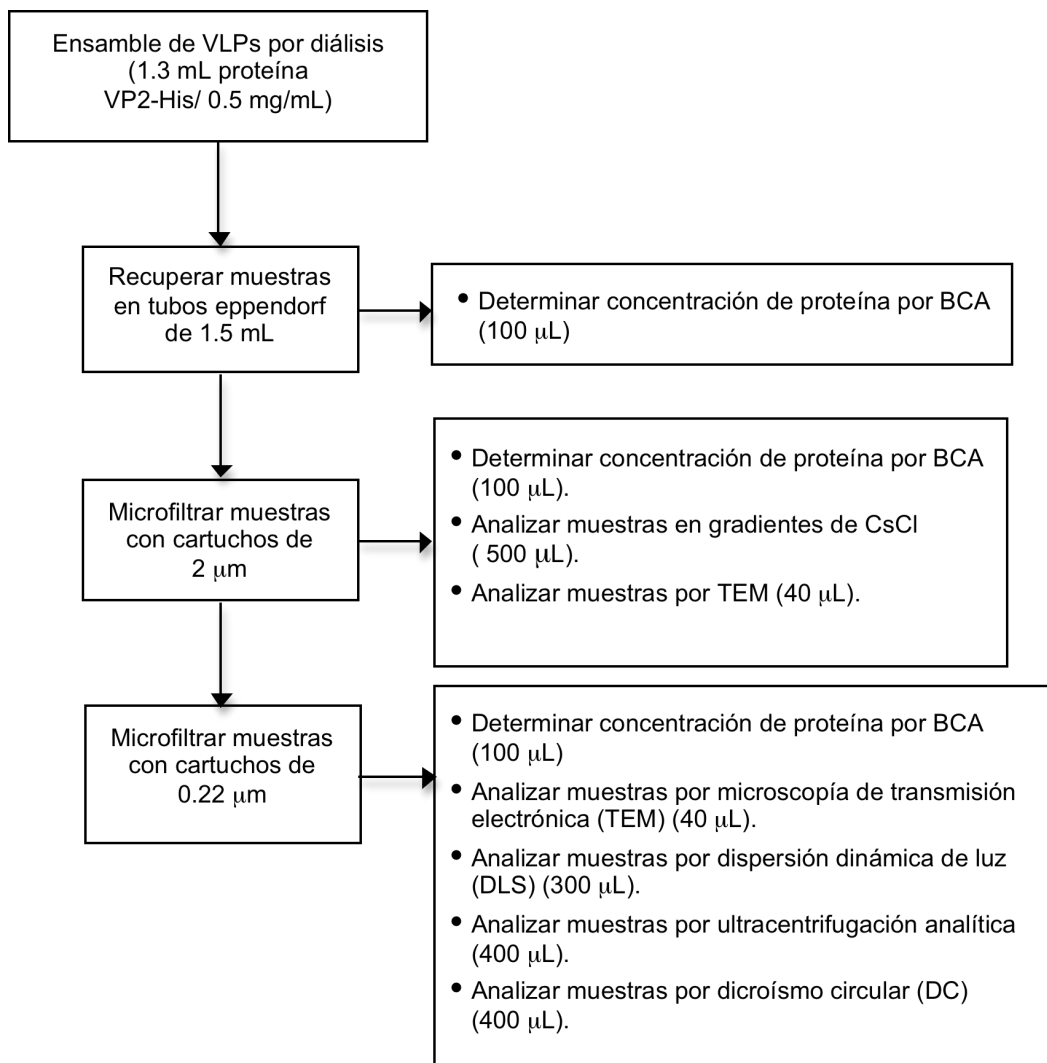
## **5.2. Ensamble *in vitro* de las VLPs a partir de la proteína VP2-His solubilizada en GuHCl 5 M.**

Se realizó un estudio detallado del efecto del pH y fuerza iónica en el ensamble de las VLPs, durante la diálisis para la eliminación del agente desnaturizante. Se utilizaron muestras de 1.3 mL de proteína VP2-His pura (0.5 mg/mL), desnaturizada en 5 M de GuHCl. Las muestras fueron dializadas a una fuerza iónica definida (0, 0.25, 0.5, 0.75 M de NaCl) y pH (4.0, 5.5, 7.0 y 8.5). Para las condiciones ácidas se utilizó amortiguador de acetatos 20 mM, para las condiciones neutras amortiguador de fosfatos 20 mM, y para las condiciones básicas amortiguador Tris-HCl 20 mM. Las muestras de 1.3 mL fueron dializadas en 50 mL de amortiguador por 36 h a 4°C, con cambios cada 12 h (Figura 26). El mismo procedimiento fue seguido para estudiar el ensamble en amortiguador PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, pH 7.4).

### **5.2.1. Caracterización de las VLPs ensambladas.**

Las partículas ensambladas fueron analizadas y caracterizadas por diversas técnicas que permitieran identificar su tamaño, densidad y morfología (Figura 25).






**Figura 25.** Esquema mostrando la metodología seguida para realizar la caracterización de las VLPs ensambladas bajo diferentes condiciones de diálisis.

### 5.2.1.1. Determinación del porcentaje de proteína soluble después de la diálisis.

Bajo ciertas condiciones de diálisis las muestras presentaron turbidez, por lo que se determinó la concentración de proteína justo después del ensamble por diálisis y también después de microfiltrar con cartuchos de 0.22 µm. La concentración de proteína fue estimada por el método de BCA, utilizando una curva patrón de albúmina. A todas las muestras y a los tubos de la curva patrón se les adicionó 0.2% de SDS para

---



poder solubilizar los agregados formados bajo ciertas condiciones de diálisis y poder obtener un valor mas acertado de la concentración de proteína.

#### **5.2.1.2. Microscopía de transmisión electrónica (TEM).**

Para los análisis por TEM, se realizó tinción negativa. Se pipetearon 20  $\mu$ l de muestra sobre papel parafilm, entonces una rejilla de cobre cubierta con formvar fue puesta sobre la muestra durante 1 min. Posteriormente la rejilla se tomó con unas pinzas y el exceso de muestra fue eliminado pasando papel filtro por la orilla de la rejilla. La rejilla se dejó secando por 5 min. Posteriormente se puso sobre una gota de ácido fosfotúngstico al 3% (pH 7) durante 1 min. La rejilla se tomó con las pinzas y se eliminó el exceso de colorante pasando papel filtro por la orilla de la rejilla. Después de la tinción las rejillas se dejaron secando durante 5 min a temperatura ambiente y posteriormente a 37°C durante 15 min. Las muestras fueron examinadas en un microscopio de transmisión electrónica (JEOL JEM-1010), utilizando un voltaje de 80 KV. Las micrografías fueron tomadas a magnificaciones entre 100,000 y 500,000 X.


#### **5.2.1.3. Dispersión dinámica de luz (DLS).**

Los análisis de DLS se realizaron en el equipo Zetasizer  $\mu$ V. El índice de refracción y la viscosidad se fijaron como 1.33 y 1.003 cP, respectivamente (Harvey *et al.*, 1998). Durante el análisis la temperatura se ajustó a 20°C. Se utilizó una celda de 500  $\mu$ L y se analizaron muestras de 300  $\mu$ L con una concentración de proteína entre 0.1 y 0.3 mg/mL. Para poder realizar el análisis, las muestras fueron microfiltradas con cartuchos de 0.22  $\mu$ m o centrifugadas a 10,000 rpm durante 5 min. A cada muestra analizada se le realizaron 10 corridas con 10 medidas de 10 seg cada una. Para definir el tamaño se realizó un promedio de las 10 corridas realizadas para cada muestra.

#### **5.2.1.4. Gradientes continuos de cloruro de cesio (CsCl).**

Después del ensamble, las VLPs fueron separadas en gradientes continuos de CsCl, ya que los diferentes componentes de la muestra (incluidas las VLPs, agregados,

---



intermediarios), pueden ser separados según su densidad. Se preparó una solución de CsCl a una densidad de 1.33 g/mL, mezclando 40.8 g de CsCl mas 79.2 mL de amortiguador de gradiente (50 mM de fosfatos, acetatos o Tris-HCl, dependiendo del pH de la muestra, con 10 mM de EDTA y 0.5% de Tritón X-100). Se colocaron 3.5 mL de la solución de CsCl en un tubo de centrifuga de 5 mL (Ultra-Clear, Beckman 11x60mm) y posteriormente 500 µL de la muestra (procurando no mezclar). La ultracentrifugación se realizó a 60,000 rpm con un rotor 60Ti (Beckman) durante 9 h a 20°C. Las bandas obtenidas en el gradiente fueron recuperadas y dializadas durante 48 h para eliminar el CsCl (se realizaron 3 cambios de amortiguador). El amortiguador utilizado durante la diálisis estuvo en función del pH de la muestra. La concentración de proteína total que se recuperó en las bandas de los gradientes fue cuantificada por BCA. Las bandas también fueron analizadas por TEM y DLS para identificar cual de las bandas corresponde a las VLPs.


#### **5.2.1.5. Ultracentrifugación analítica.**

Los análisis de velocidad de sedimentación fueron realizados en una ultracentrífuga analítica Beckman Optima XL-I, equipada con un rotor AN-50Ti (Beckman). Muestras de 400 µL (con una concentración de proteína entre 0.1 y 0.3 mg/mL) fueron puestas en el compartimento de las muestras y en el compartimento de referencia se colocaron 400 µL de amortiguador. El análisis se realizó a 20°C, con una velocidad constante de 10,000 rpm durante 24 h. Los patrones de sedimentación fueron registrados cada 10 min con un escáner de UV a 280 nm. Los coeficientes de sedimentación aparentes fueron calculados usando el programa SEDIFT.

#### **5.2.1.6. Inmunodetección de proteínas (Western blot).**

Las proteínas (10 µg) separadas en geles de SDS-PAGE al 12.5% se transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa utilizando el sistema Mini-translot (Bio-Rad). A continuación, las membranas se bloquearon durante 1 h con leche descremada al 5% en amortiguador TBS (Tris 20 mM, NaCl 500 mM; pH 7.5). Se realizaron 2 lavados de 5 min con amortiguador TTBS (Tris 20 mM, NaCl 500 mM,

---



Tween-20 al 0.1%; pH 7.5) para poder incubar con el anticuerpo primario (Anti-Parvovirus B19 R92F6, Chemicon Millipore) durante 1 h a temperatura ambiente. Tras lavar las membranas 3 veces con amortiguador TTBS, se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario (diluido 1:30,000 y adicionado con 1% de BSA) durante 1 h a temperatura ambiente. Tras lavar 3 veces con TTBS y una con TBS, el Western blot se reveló con el reactivo de quimiluminiscencia SuperSignal West Dura (Pierce), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Por último se expuso a una película BioMa XAR film de (Sigma).

### **5.2.2. Efecto de la concentración inicial de GuHCl en el ensamble de las VLPs.**

Se estudiaron diferentes concentraciones iniciales de GuHCl (0.5, 1, 2, 3, 4, 5 M de GuHCl). Se utilizó la proteína VP2-His que se encuentra almacenada en amortiguador de replegamiento (Tris-HCL 20 mM, NaCl 0.15 M, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, GuHCl 5M; pH 8), a una concentración aproximada de 2 mg/mL. La concentración inicial de GuHCl fue ajustada con amortiguador de replegamiento sin GuHCl, posteriormente se ajustó la concentración de proteína a 0.5 mg/ mL con un amortiguador que tuviera la misma concentración de GuHCl que la muestra. Se dializaron muestras de 1.3 mL en 50 mL de amortiguador pH 7.0 con 0.5 M de NaCl durante 36 h a 4°C (se realizaron 3 cambios de amortiguador). Después de la diálisis las muestras fueron caracterizadas por TEM y gradientes de CsCl.

### **5.2.3. Ensamble de las VLPs por cambio de pH.**

Muestras de 1.3 mL de proteína VP2-His (0.5 mg/mL) primero fueron dializadas en amortiguador de acetatos 20 mM pH 4 con 0.25 M de NaCl durante 24 h a 4°C. Posteriormente las muestras fueron dializadas en amortiguador de fosfatos 20 mM con 0.5 M de NaCl y pH 7, por 12 h más a la misma temperatura. Después de la diálisis las muestras fueron caracterizadas por TEM y gradientes de CsCl. Las partículas ensambladas por cambio de pH, fueron comparadas con muestras dializadas en pH 4.0 y 7.0.



---

#### **5.2.4 Efecto de la temperatura en el ensamble de las VLPs.**

Muestras de 1.3 mL de proteína VP2-His (0.5 mg/mL) fueron dializadas en amortiguador PBS durante 36 h (con 3 cambios de amortiguador) a 4°C y a 37°C. Después de la diálisis, se determinó el porcentaje de proteína soluble que se recupera en cada una de las temperaturas estudiadas. Primero, 1 mL de cada una de las muestras se microfiltró con membranas de 2 µm y posteriormente con membranas de 0.22 µm de tamaño de poro. Se determinó la concentración de proteína por BCA, antes y después de cada etapa de microfiltración. Las muestras microfiltradas con membranas de 0.22 µm fueron analizadas por TEM y DLS; y las muestras microfiltradas con membranas de 2 µm de poro fueron analizadas en gradientes de CsCl, utilizando las mismas condiciones descritas anteriormente (apartado 5.2.1.4). Después del gradiente se recuperaron las bandas y se dializaron en amortiguador PBS durante 36 h a 4°C. Después de la diálisis se determinó la cantidad de proteína que se recupera en cada una de las bandas que se forman durante el gradiente.

#### **5.2.5. Efecto de la concentración de proteína inicial.**

Se estudiaron diferentes concentraciones de proteína inicial (0.25, 0.50, 0.75 y 1.00 mg/mL). La concentración de proteína se ajustó mediante dilución de la proteína con amortiguador de replegamiento. Después de ajustar la concentración, muestras de 1.3 mL fueron dializadas en amortiguador PBS durante 36 h a 4°C (con 3 cambios de amortiguador). Después del ensamble se determinó el porcentaje de proteína soluble siguiendo la metodología del apartado 5.2.1.1. También las muestras fueron caracterizadas por DLS (apartado 5.2.1.3).

### **5.3. Estudios de estabilidad.**

#### **5.3.1. El efecto de temperatura sobre la estabilidad de las VLPs.**

Muestras dializadas en amortiguador PBS (pH 7.4), fueron microfiltradas con cartuchos de 0.22 µm, para recuperar sólo las partículas completamente solubles. El efecto de la



---

temperatura sobre las VLPs se determinó midiendo los cambios en el diámetro efectivo de las partículas por DLS. Se analizaron muestras de 300  $\mu$ L con una concentración entre 0.08 y 0.15 mg/mL de proteína. Primero se hizo una rampa de temperatura de 20°C a 90°C, en la cual se realizaron 10 determinaciones por cada incremento de 10°C.

En otro estudio, se realizaron cinéticas a temperaturas específicas (30, 40, 50, 60 y 80°C). En cada una de las temperaturas, se realizaron 5 determinaciones cada minuto por un periodo de 35 min. Las muestras que fueron incubadas a 30, 40, 60 y 80°C durante 30 min también fueron analizadas por TEM y por gradientes de CsCl.

### **5.3.2. Efecto del SDS en la desagregación y desensamble de las VLPs.**

El efecto del SDS sobre las propiedades agregativas y la estabilidad de las partículas fue analizado por diversas técnicas como son: DLS, cromatografía de exclusión molecular (SEC), dicroísmo circular y también siguiendo la pérdida de turbidez (Abs<sub>600nm</sub>) (Figura 26). Se utilizaron muestras dializadas en amortiguador PBS (pH 7.4). Después de la diálisis las muestras presentan turbidez, indicando la agregación de las partículas. Muestras directas después de la diálisis (partículas agregadas) y muestras microfiltradas con membranas de 0.22  $\mu$ m de poro (partículas completamente solubles) fueron expuestas a diferentes concentraciones de SDS de 0.01 a 0.20%. Para la caracterización del efecto del SDS, se realizaron diversos análisis:

- 1) Se realizó un estudio cinético de pérdida de turbidez siguiendo la absorbancia a 600 nm durante 25 min, para este análisis se utilizó un lector de placas.
- 2) Muestras expuestas de 0 a 0.05% de SDS durante 1 h fueron analizadas en gradientes de CsCl. A cada solución de CsCl se le adicionó el porcentaje específico de SDS que tuviera la muestra. Las condiciones en la centrifuga y preparación de las muestras fueron las mismas que en el apartado 10.1.
- 3) Los cambios en el diámetro de las partículas fue seguido por DLS (siguiendo la metodología del apartado 5.2.1.3), se hicieron 5 determinaciones cada minuto por un periodo de 20 min y también 5 mediciones a las 2h, 4h y 24h. Se

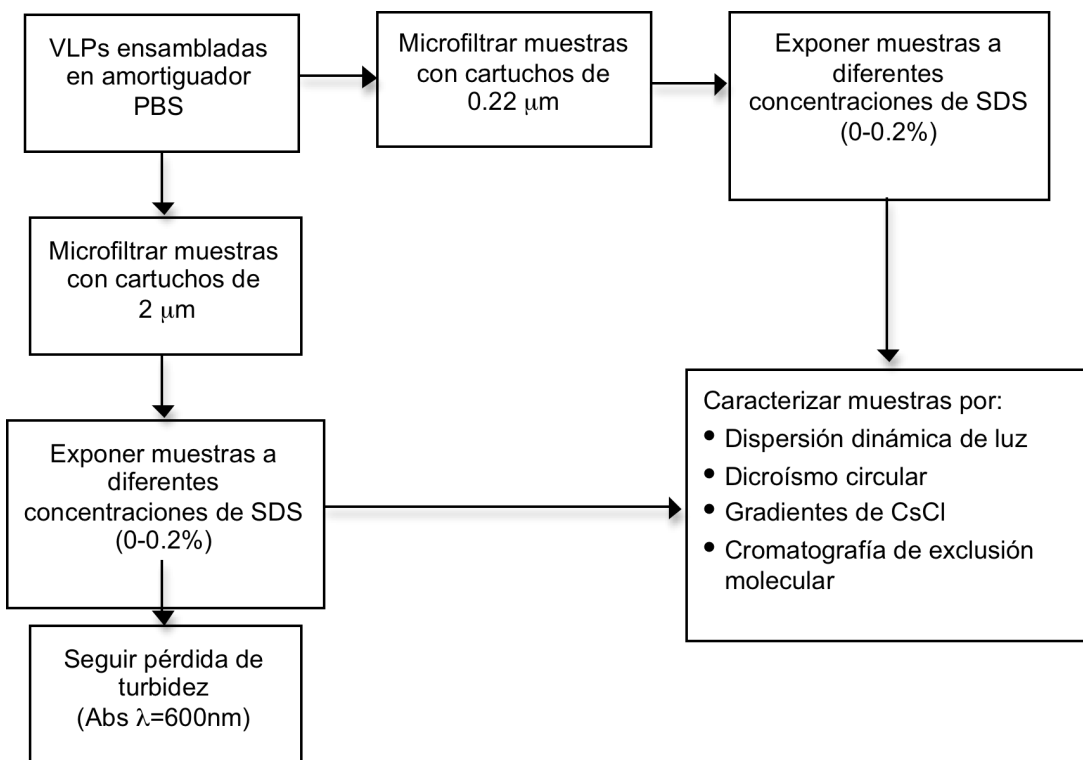




---

analizaron muestras de 300  $\mu$ L microfiltradas y sin microfiltrar después de exponerlas a las diferentes concentraciones de detergente.

- 4) Muestras expuestas durante 24 h a 0.05% de SDS también fueron analizadas por cromatografía de exclusión molecular en un HPLC marca waters (600S/2487), se utilizó una columna superdex 200 pre-equilibrada con el mismo amortiguador presente en la muestra, ya sea PBS o acetatos 20 mM, con NaCl 0.25 M; pH 4, ambos con la presencia de 0.05% de SDS. Se inyectaron muestras de 500  $\mu$ L y se utilizó un flujo de 1 mL/min. La elución de la proteína fue monitoreada siguiendo la absorbancia a 280 nm. La columna fue calibrada utilizando como estándares las siguientes proteínas globulares (MWGF1000-1KT, amplio rango de pesos moleculares de 29,000-700,000, para filtración en gel): anhidrasa carbónica (29 kDa), albúmina sérica bovina (66 kDa),  $\beta$ -amilasa (200 kDa), apoferritina (443 kDa), y tiroglobulina (669 kDa). El volumen muerto fue determinado con azul dextran (2000 kDa).
- 5) Se estudiaron los cambios de elipticidad en la proteína al ser expuesta a diferentes concentraciones de SDS. Se utilizó el equipo Jasco J-715, utilizando una sensibilidad de 20 mdeg y un tiempo de respuesta de 8 seg. Para el análisis se utilizaron muestras de 400  $\mu$ L y una celda de cuarzo de 0.1 mm de paso de luz, la cual se colocó en el espectropolarímetro a temperatura constante de 20°C. Los espectros (3 acumulaciones) fueron obtenidos a una velocidad de escaneo de 20 nm/min en el UV lejano en un intervalo de 200 a 245 nm, ya que a longitudes de onda menores los espectros presentan bastante ruido debido a un incremento en el voltaje. Se calculó la elipticidad molar a cada uno de los espectros obtenidos, considerando la concentración de proteína en cada una de las muestras.



**Figura 26.** Metodología propuesta para estudiar el efecto del SDS en la estabilidad de las VLPs.

### 5.3.3. Estudios de re-ensamble de las VLPs por remoción del SDS.

Para este estudio primero se llevó a cabo la disociación de las partículas al exponerlas a 0.05% de SDS durante 1 h. Después de este tiempo las muestras fueron analizadas por DLS para definir el tamaño de las partículas. Posteriormente, las muestras expuestas al SDS (microfiltradas y sin microfiltrar), se pusieron a dializar en amortiguador PBS durante 36 h (con 3 cambios de amortiguador para procurar eliminar por completo todo el detergente presente en las muestras).

En otro estudio las VLPs primero se disociaron por exposición a 0.2% de SDS durante 24 h. Posteriormente las muestras fueron dializadas en amortiguador con concentraciones específicas de SDS (0.0125, 0.025 y 0.05%), durante 36 horas a temperatura ambiente (se realizaron 3 cambios de amortiguador). Para identificar el re-ensamble de las partículas, las muestras fueron analizadas por DLS, TEM y dicroísmo circular.



---

#### **5.3.4. Efecto de la urea y del GuHCl en la desagregación y desensamble de las VLPs.**

Partículas ensambladas en PBS fueron expuestas a diferentes concentraciones de urea o de GuHCl (de 0 a 6 M) durante 15 min, 2, 4 y 24 h. Se estudió la disminución de turbidez siguiendo la absorbancia a 600 nm, el tamaño de las especies obtenidas por DLS y la desestabilización de la estructura secundaria mediante dicroísmo circular.

#### **5.4. Efecto de la arginina durante el ensamble de las VLPs.**

Se realizó un estudio detallado del efecto de la adición de arginina y pH durante el ensamble de las partículas por diálisis. Se utilizaron muestras de 1.3 mL de proteína VP2His pura (0.5 mg/mL), desnaturalizada en 5 M de GuHCl. Las muestras fueron dializadas en diferentes concentraciones de arginina (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 M) y pH (4.0, 5.5, 8.5 y en PBS). Para condiciones ácidas se utilizó amortiguador de acetatos 20 mM y para condiciones básicas amortiguador Tris-HCl 20 mM. Las muestras de 1.3 mL fueron dializadas en 50 mL de amortiguador, durante 36 h a 4°C, (también se realizaron 3 cambios de amortiguador). Después de la diálisis, se caracterizó el ensamble de las partículas por DLS, TEM y SEC. También se determinó el porcentaje de proteína soluble para cada condición de diálisis estudiada.



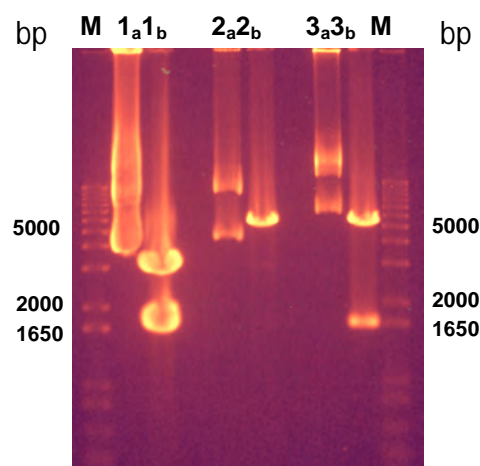
## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Producción y recuperación de la proteína estructural VP2.

En el apartado 6.1 se explica a detalle cuales son las mejores condiciones encontradas para la producción y purificación de la proteína VP2. A partir del apartado 6.2 se explican los resultados relacionados con el ensamble y estabilidad de las partículas producidas.

#### 6.1.1. Clonación y expresión de la proteína estructural VP2 en *E. coli*.

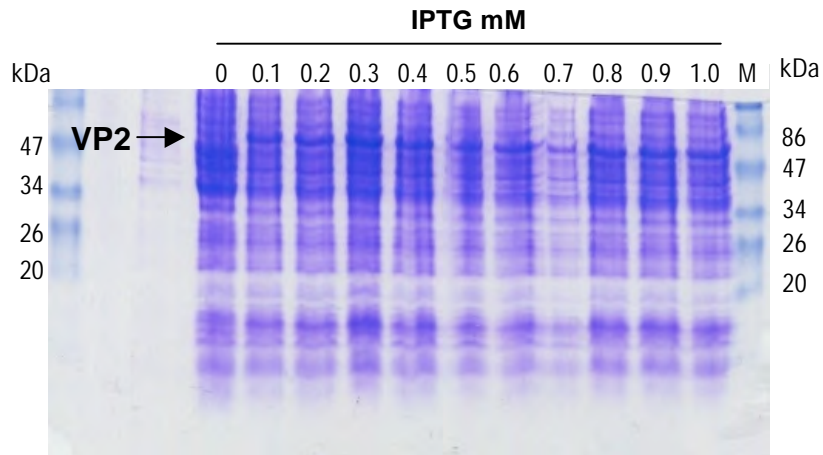
En este proyecto se propuso utilizar a *E. coli* como sistema de expresión para la obtención de la proteína VP2 del PB19. Hasta ahora los únicos sistemas de expresión en los que se ha demostrado la obtención de VLPs del PB19 solubles y con buenos rendimientos son células de insecto y *Saccharomyces cerevisiae* (Kajigaya *et al.*, 1991; Lowin *et al.*, 2005). La secuencia del gen *vp2* se obtuvo clonada en el vector pBluescriptII (+/-). Posteriormente se llevó a cabo la construcción del vector pETVP2 mediante la subclonación del gen *vp2* entre los sitios *NdeI* y *EcoRI* del vector de expresión pET22b(+). Mediante una digestión con las mismas enzimas de restricción se pudo verificar la presencia del gen *vp2* en este vector (Figura 27). Con este plásmido se transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3).



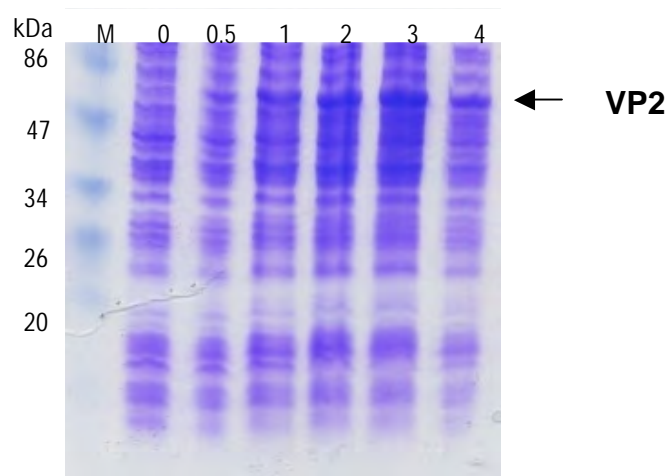
**Figura 27.** Gel de agarosa. El carril M corresponde a los marcadores de peso molecular, los carriles 1<sub>a</sub> y 1<sub>b</sub> corresponden al plásmido pBSKVP2 sin digerir y digerido con las enzimas *NdeI* y *EcoRI*, respectivamente; los carriles 2<sub>a</sub> y 2<sub>b</sub> corresponden al plásmido pET22b(+) sin digerir y digerido con las enzimas *NdeI* y *EcoRI*, respectivamente; y los carriles 3<sub>a</sub> y 3<sub>b</sub> corresponden al plásmido pETVP2 sin digerir y digerido con las enzimas *NdeI* y *EcoRI*, respectivamente.



Primero se estudió la expresión de la proteína VP2 (58 kDa) en función de la concentración de IPTG y se encontró que es suficiente 0.1 mM para obtener una buena expresión (Figura 28). También se encontró que son suficientes 3 horas de inducción para obtener una buena expresión de la proteína (Figura 29).



**Figura 28.** Expresión de la proteína VP2 (58 kDa) en *E. coli* BL21 en función de la concentración de IPTG (0 a 1 mM).

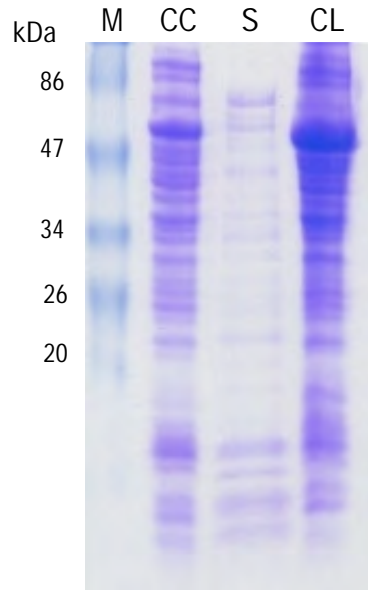


**Figura 29.** Expresión de la proteína VP2 (58 kDa) en *E. coli* BL21 en función del tiempo (0 a 4 h) con 0.25 mM de IPTG.

La proteína VP2 se expresó en forma de cuerpos de inclusión, ya que después de lisar las células y centrifugar, la proteína se recupera en la porción insoluble (Figura 30). Se estudiaron diversas condiciones para evitar la formación de cuerpos de inclusión, por



ejemplo, disminución de la temperatura durante la inducción, así como de la concentración de IPTG, velocidad de agitación y tiempo de inducción, pero no se logró incrementar el rendimiento de proteína soluble.



**Figura 30.** Formación de cuerpos de inclusión. El carril CC corresponde a las células completas. Los carriles S y CL al sobrenadante y al pellet después de lisar las células mediante sonicación.

Hasta ahora no existen estudios en los que se haya reportado la formación de cuerpos de inclusión para el PB19, y son contados los estudios para otros virus. Generalmente para la recuperación de las proteínas insolubles se utilizan amortiguadores con detergentes (SDS, Triton X-100), agentes caotrópicos (urea, cloruro de guanidinio) y agentes reductores ( $\beta$ -mercaptoetanol y DTT). Por ejemplo, Cao *et al.* (2005), reportaron la purificación de la proteína BAFF, que se expresa en forma de cuerpos de inclusión, utilizando varios lavados y etapas de centrifugación. Primero lavaron el pellet con 40 mL de amortiguador 1 (Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, NaCl 0.15 M, pH 8.0), después con amortiguador 1 más 3.0 M de urea (este lavado lo repitieron 3 veces). El último lavado lo realizaron con amortiguador 1 conteniendo 0.5% de Tritón X-100 y también lo repitieron 3 veces. Los cuerpos de inclusión lavados los disolvieron en 8 mL de amortiguador 1 conteniendo 8.0 M de urea y 0.1 M de DTT. Otra metodología muy parecida es la reportada por Wingfield *et al.* (2007), quienes realizaron la purificación de una proteasa del dominio extracelular del virus HIV, mediante varios lavados de los



---

cuerpos de inclusión y posteriormente solubilizándolos con amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8.0 conteniendo GuHCl 8.0 M y DTT 50 mM. Su purificación la finalizaron con una filtración en gel utilizando una columna Superdex 200 (6.0x 60 cm) pre-equilibrada con amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8.0 conteniendo GuHCl 5.0 M y DTT 10 mM.

### **6.1.2. Purificación de la proteína VP2 a partir de cuerpos de inclusión.**

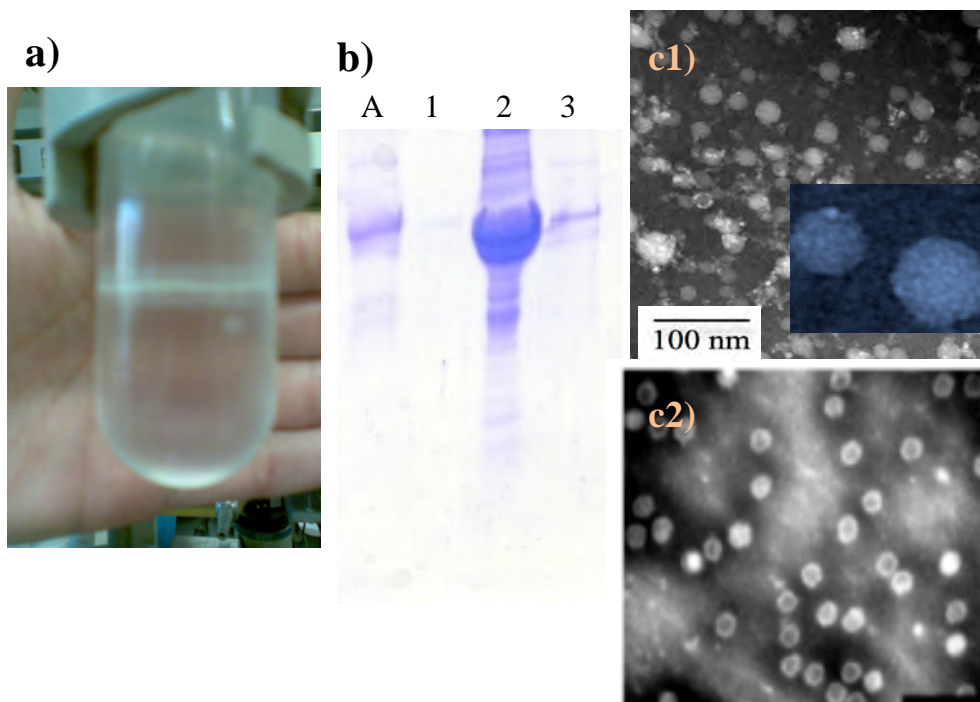
Para la recuperación de la proteína VP2, se propuso lisar las células adicionando urea 8 M, ya que además de tener un efecto lisente, permitió incrementar la pureza de los cuerpos de inclusión debido a la solubilización y eliminación de proteínas contaminantes. Mediante varios lavados con diferentes soluciones se pudo incrementar aún más la pureza de los cuerpos de inclusión recuperados después de la lisis con urea. Primero se intentó solubilizar los cuerpos de inclusión con urea 8.0 M, pero se encontró que las proteínas no se solubilizan completamente con este agente desnaturante. La muestra queda turbia y las proteínas no se logran separar por filtración en gel en condiciones desnaturantes con urea 8 M, ya que todas salen en el volumen de elución de la columna, esto sugiere la formación de agregados de proteína parcialmente desnaturada (datos no mostrados). La desnaturación y solubilización de los cuerpos de inclusión fue mejorada al utilizar GuHCl 6 M, por lo que se decidió seguir trabajando con este agente desnaturante. Para la purificación de la proteína se realizaron varias etapas de filtración en gel en condiciones desnaturantes, utilizando una columna S-200. Mediante esta metodología se logró incrementar la pureza de la proteína VP2 a un (85%), pero fueron necesarias altas concentraciones de GuHCl y la cantidad de proteína recuperada por litro de medio de cultivo fue baja (13-18 mg) (Anexo 6).

A la par de la purificación también se estudió el ensamble de las partículas virales. Se demostró la formación de las VLPs *in vitro*, a partir del replegamiento de la proteína VP2 parcialmente pura y solubilizada en GuHCl 5.0 M. El ensamble se confirmó mediante gradientes de CsCl y TEM (Figura 31). Las principales especies ensambladas presentaron un tamaño entre 20-23 nm y una morfología y densidad (1.29





g/mL) similar a la de las VLPs del PB19 formadas con la proteína VP2, obtenidas a partir de sistemas de expresión como células de insecto y *Saccharomyces* (Figura 31) (Kajigaya *et al.*, 1991 y Lowin *et al.*, 2005). La habilidad de ensamblar las partículas completamente *in vitro* a partir de la proteína VP2 desnaturalizada en GuHCl 5.0 M, hace a este sistema muy interesante, ya que sería posible obtener un alto rendimiento de VLPs, además de que sería factible su aplicación por ejemplo en el encapsulamiento de diversas moléculas. Muchos virus no tienen la capacidad de autoensamblarse a partir de proteína completamente desnaturalizada, por ejemplo, Lee y Tan reportaron que el virus de la Hepatitis B pierde su capacidad de autoensamblarse después de ser expuesto a 3 M de GuHCl por períodos de tiempo cortos.

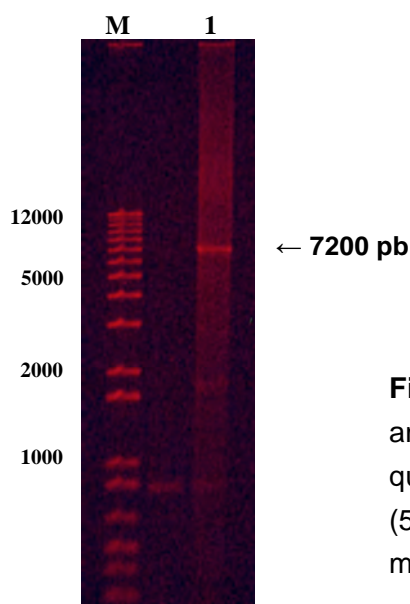


**Figura 31.** Partículas tipo virus obtenidas después del replegamiento de la proteína VP2 mediante diálisis. a) Gradiente de CsCl. b) Electroforesis de las tres capas obtenidas en el gradiente, el carril A corresponde a la muestra antes del gradiente, el 1 a la capa superior del gradiente, el 2 a la central y el 3 a la inferior. c) Microscopía electrónica, c1 corresponde a la capa central del gradiente y c2 a las VLPs ya reportadas a partir de la expresión de la proteína VP2 en baculovirus a una magnificación de 200,000 X (la escala en la barra es de 100 nm) (Heegaard y Brown, 2002).

---

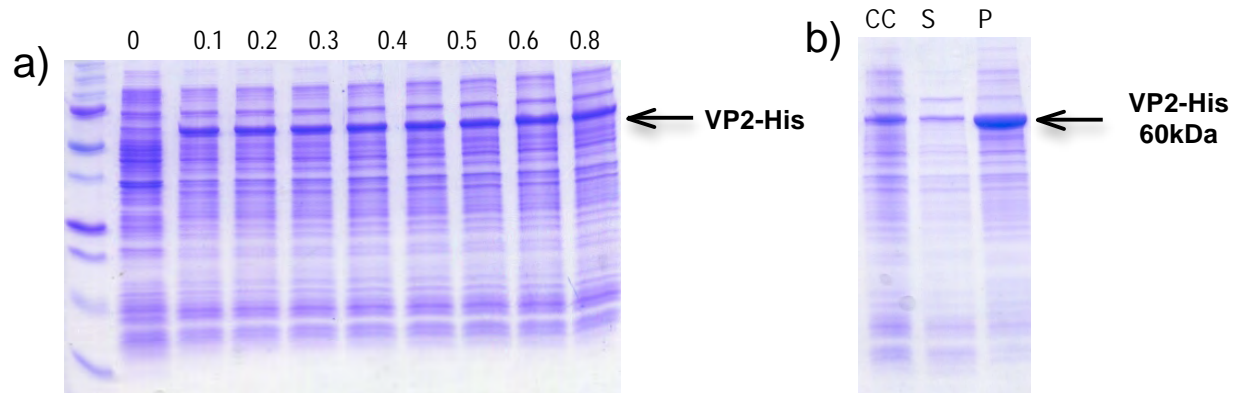
### 6.1.3. Inclusión de una etiqueta de histidinas en el extremo C-terminal de la proteína VP2.

Con el objetivo de obtener mayores rendimientos de proteína VP2 y simplificar la purificación, se decidió insertar una etiqueta de histidinas en el extremo C-Terminal. Se utilizó como templado la misma construcción en la que se tenía clonado el gen *vp2* (pET 22bVP2), aprovechando que presenta un fragmento de etiquetas de histidinas (Figura 23). Como se explica en la metodología, se diseñaron los cebadores específicos para poder amplificar y ligar el gen *vp2* a la etiqueta de histidinas. El producto de PCR está flanqueado por dos sitios de restricción *Xho*I, el que naturalmente se encuentra en el vector en la dirección 3' y que es amplificado por el primer forward, y el introducido por el primer reverse. El producto de PCR fue cortado con la enzima de restricción *Xho*I, y posteriormente ligado consigo mismo utilizando ligasa de T4. Se confirmó el tamaño del producto de la ligación mediante un gel de agarosa al 1% (Figura 32).



**Figura 32.** Gel de agarosa en el que se muestra la amplificación del vector pET 22b+-VP2-HIS. El gen que se amplificó corresponde al tamaño del vector (5450 pb) más el fragmento del gen *vp2* (1650 pb), menos el fragmento que se eliminó (36 pb).

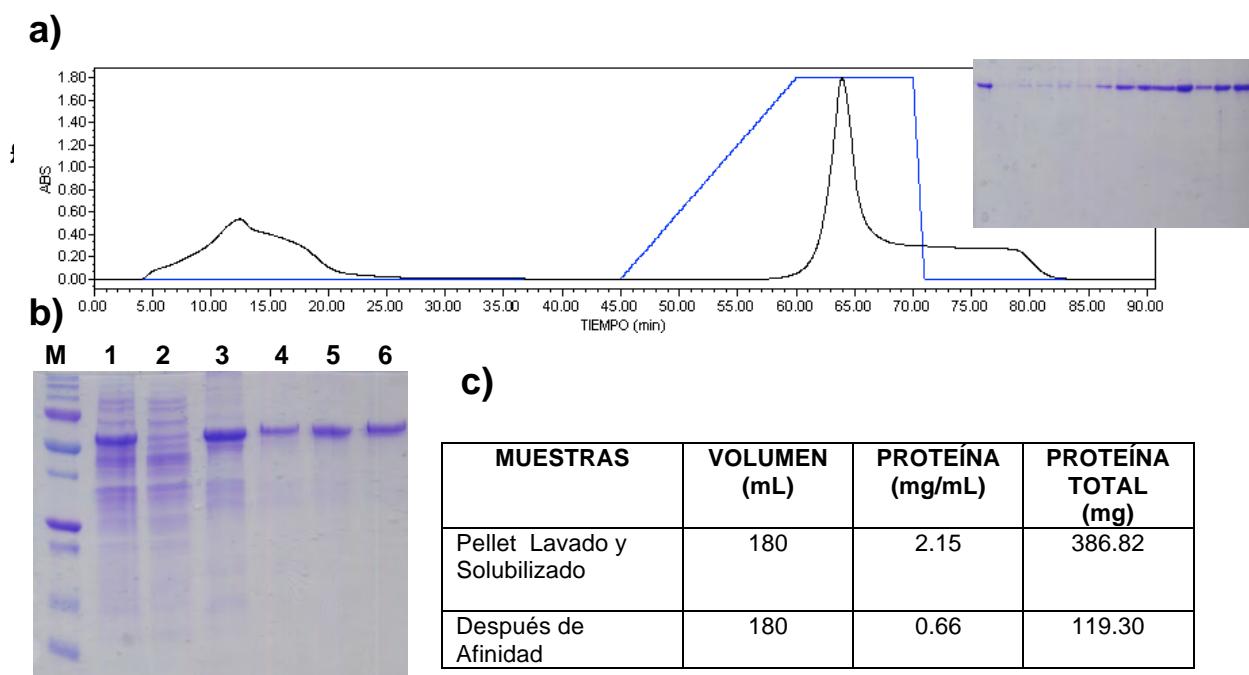
Después de transformar células de *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido pETVP2His, se estudió la expresión de la proteína en función de la concentración de IPTG. Fue suficiente una concentración de 0.1 mM para obtener una buena expresión de la proteína VP2-His (Figura 33a). Al igual que con la proteína VP2, en este caso también se formaron cuerpos de inclusión (Figura 33b).



**Figura 33.** a) Expresión de la proteína VP2-His en función de la concentración de IPTG (de 0 a 0.8 mM) y b) Formación de cuerpos de inclusión. El carril CC corresponde a las células completas y el S y P al sobrenadante y pellet, respectivamente; recuperado después de lisar las células mediante sonicación.

#### 6.1.4. Purificación de la Proteína VP2-His.

La recuperación de la proteína a partir de los cuerpos de inclusión se dividió en 3 etapas: 1) Lavado de cuerpos de inclusión, 2) Solubilización de los cuerpos de inclusión proteína en amortiguador de solubilización (GuHCl 6 M) y 3) Purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad en condiciones desnaturizantes (Figura 34). Mediante la inclusión de la etiqueta de histidinas se logró simplificar la metodología para la purificación de la proteína y comparando con la proteína VP2 sin histidinas, se incrementó considerablemente la cantidad de proteína recuperada por litro de medio de cultivo, de 13 a 60 mg, presentando una pureza del 95%. Este sistema es una buena alternativa a otros sistemas heterólogos de expresión, como células de levaduras o de insectos, ya que los rendimientos de proteína son mayores. Además la facilidad de expresión y purificación de la proteína VP2 puede representar una ventaja para la aplicación de la VLPs del PB19 en el área biomédica. También se identificó la identidad de la proteína por Western blot usando un anticuerpo anti-Parvovirus B19 (Anexo 7). Por ésta técnica también se identificaron algunas bandas de menor peso molecular, de entre 28 y 33 kDa. Al parecer una porción de la proteína se degrada durante el proceso purificación, lo que podría deberse a la presencia de proteasas en la muestra.



**Figura 34.** a) Cromatografía de afinidad en condiciones desnaturalizantes (6 M de GuHCL). Con una columna Protino Ni-TED (20 mL), se hicieron corridas con 20 mL de pellet lavado y solubilizado, la proteína se eluyó mediante un gradiente de imidazol (20 a 500 mM) en 6.0 M de GuHCl. b) SDS-PAGE con las diferentes etapas de purificación, línea M marcador de peso molecular, línea 1 células lisadas, línea 2 sobrenadante después de la lisis, línea 3 pellet después de la lisis, línea 4 y 5 pellet después de los lavados y 6 proteína después de la cromatografía de afinidad. c) Tabla mostrando la proteína total recuperada después del lavado de los cuerpos de inclusión y de la cromatografía de afinidad (2 L de medio de cultivo).

## 6.2. Ensamble *in vitro* de las VLPs del PB19 a partir de la proteína VP2-His.

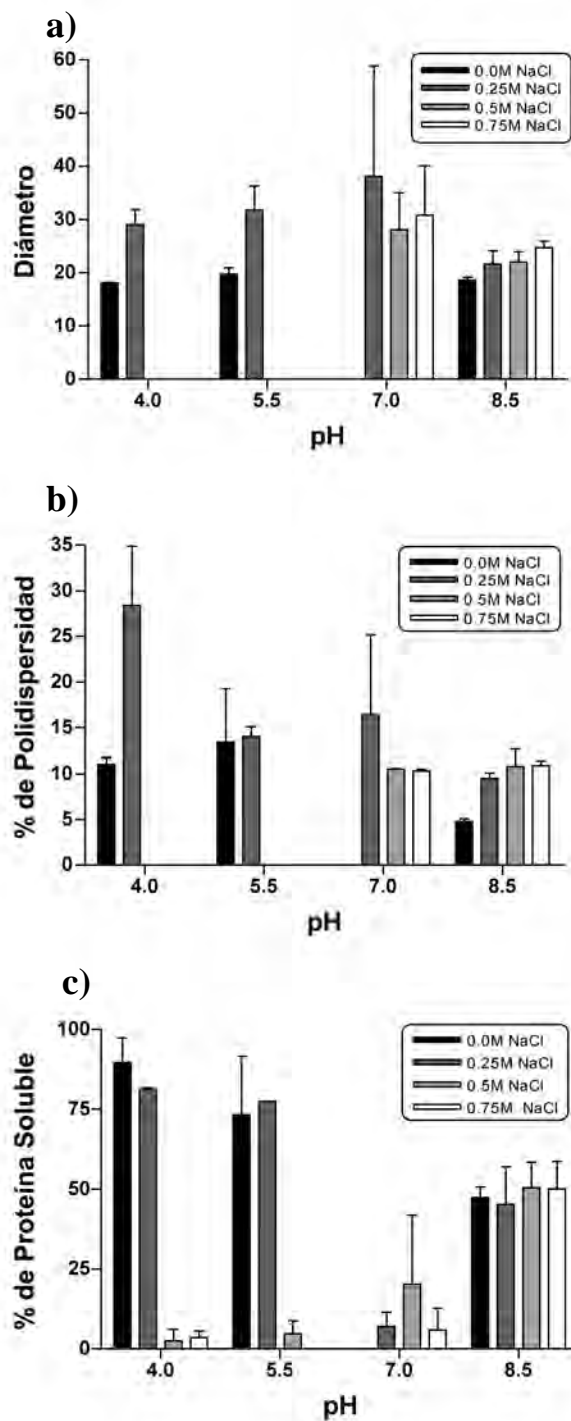
### 6.2.1. Efecto del pH y la fuerza iónica

Después de estandarizar las condiciones para la purificación de la proteína VP2-His, se decidió hacer un estudio detallado del efecto del pH y fuerza iónica en el ensamble de las partículas, ya que se ha demostrado que es un proceso complejo que puede depender de estos factores y así como de otros, por ejemplo, de la presencia de solutos de bajo peso molecular como  $\text{CaCl}_2$  o DTT. En algunos estudios se ha demostrado que las VLPs de algunos virus cambian de tamaño en función del pH y esto se ha aprovechado para el encapsulamiento y liberación selectiva de diversas moléculas (Douglas et al., 1998; Chen et al., 2006). Por ejemplo, Lavelle et al., (2009) reportaron que durante el autoensamble de las proteínas de la cápside del virus CCMV se pueden obtener diversas formas y tamaños en función del pH y fuerza iónica (anexo



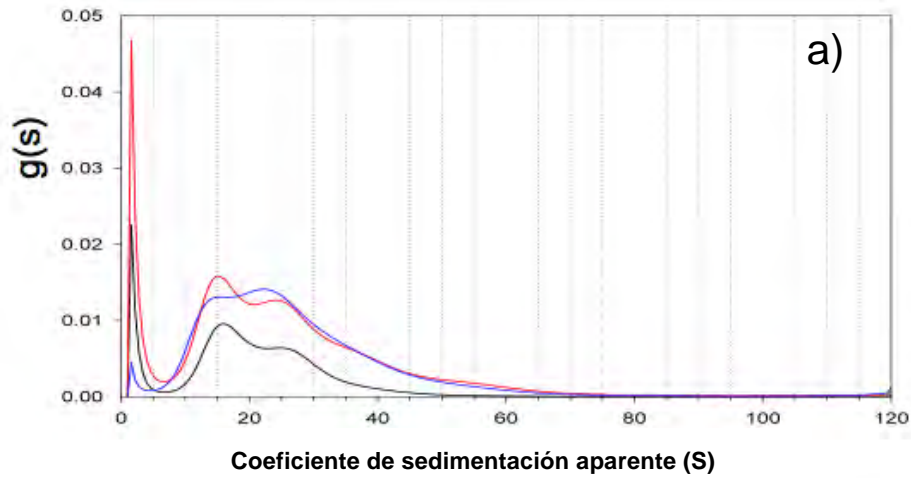
8). Ellos atribuyen el rango de polimorfismo en términos de interacciones electrostáticas y en la curvatura espontánea que se da al comenzar las interacciones entre las subunidades de proteínas.

Durante el ensamble de las partículas por diálisis, se estudiaron 4 valores de pH (4.0, 5.5, 7.0 y 8.5) y 4 fuerzas iónicas (0, 0.25, 0.50 y 0.75 M de NaCl). Se utilizaron muestras de 1.3 mL de proteína VP2-His pura (0.5 mg/mL) y desnaturalizada en GuHCl 5.0 M. Se determinó el tamaño de las partículas por DLS y el porcentaje de proteína soluble, ya que bajo ciertas condiciones de diálisis las muestras presentaron turbidez, indicando la agregación de la proteína (Figura 35). Se encontró que a pH bajo (4.0 y 5.5) y baja fuerza iónica (0 y 0.25 M de NaCl) se tiene un alto porcentaje de proteína soluble, pero el diámetro de las partículas fue menor al esperado (Figura 35a). A pH 4.0 con 0.25 M de NaCl se observó un diámetro de las partículas entre 25 y 30 nm, pero la polidispersidad del pico fue muy alta indicando la presencia de múltiples especies (Figura 35b). Esto se comprobó por ultracentrifugación analítica (AUC), ya que se identificaron especies con un peso molecular entre 420 y 770 kDa y por TEM se observaron especies entre 13 y 20 nm de diámetro, indicando la presencia de diversos intermediarios de ensamble que podrían ser oligocapsómeros (Figura 36). A pH ácido y concentraciones de NaCl mayores a 0.5 M, se provoca la agregación completa de la proteína. En pH básico, independientemente de la fuerza iónica, se recuperó alrededor de un 50% de proteína soluble (Figura 35c), pero por AUC y TEM sólo se lograron identificar especies de menor tamaño que el esperado para las VLPs (Figura 36). Lo anterior indica que en estas condiciones tampoco se tiene un ensamble completo de las partículas, sólo hay formación de oligocapsómeros. Sin embargo en pH 7.0, aunque se tiene la formación de turbidez y un bajo porcentaje de proteína soluble (20-30%), mediante TEM se lograron identificar partículas homogéneas principalmente con un tamaño entre 18-22 nm (Figura 36b3). Estos resultados sugieren que la turbidez presente en las muestras no corresponde a proteína mal plegada, por lo que es posible que durante la diálisis las partículas primero se ensamblen y posteriormente estas tiendan a agregarse y precipitar. El pH y la fuerza iónica afectan el ensamble de las VLPs, presumiblemente por un efecto en las interacciones electrostáticas entre subunidades.

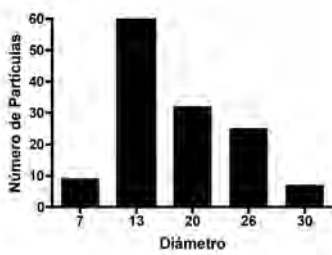
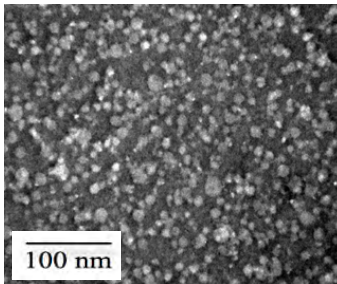


**Figura 35.** Efecto del pH y fuerza iónica durante el ensamble de las VLPs por diálisis. a) Diámetro de las principales especies obtenidas por dispersión dinámica de luz. b) Polidispersidad que presentan los picos obtenidos en la figura a. c) Porcentaje de proteína soluble obtenida en cada una de las condiciones estudiadas (el porcentaje de proteína soluble se refiere a la proteína que se recupera después de microfiltrar las muestras con cartuchos de 0.22  $\mu\text{m}$  con respecto a la proteína total antes de microfiltrar).

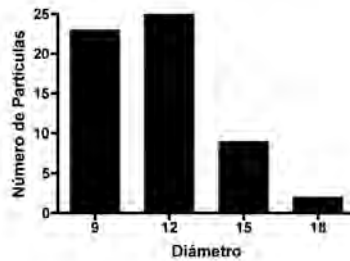
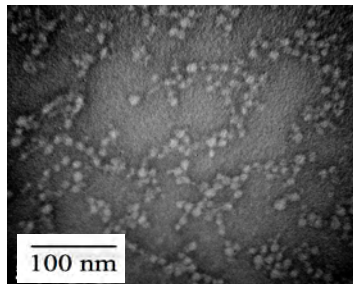




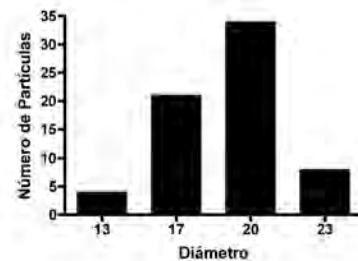
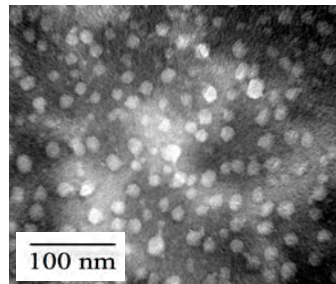
b1



b2



b3



**Figura 36.** Caracterización de las partículas obtenidas en diferentes condiciones de diálisis. a) Análisis por AUC a una velocidad constante de 10,000 rpm durante 24 h a 4°C, la línea negra corresponde a la muestra dializada en pH 4.0 con 0.25 M de NaCl ( $OD_{280nm} = 0.21$ ), la línea azul corresponde a la muestra a pH 4.0 con 0.25 M de NaCl pero concentrada después de la diálisis ( $OD_{280nm} = 0.45$ ) y la línea roja a la muestra dializada a pH 8.5 con 0.5 M de NaCl. La muestra diálizada a pH 7.0 con 0.5 M de NaCl no se pudo analizar por AUC, debido al bajo porcentaje de proteína soluble que se recupera. b) Micrografías y distribución del tamaño de las partículas obtenidas en las 3 condiciones estudiadas. b1) pH 4.0 con 0.25 M de NaCl, b2) pH 8.0 con 0.5 M de NaCl y b3) pH 7.0 con 0.5 M de NaCl.





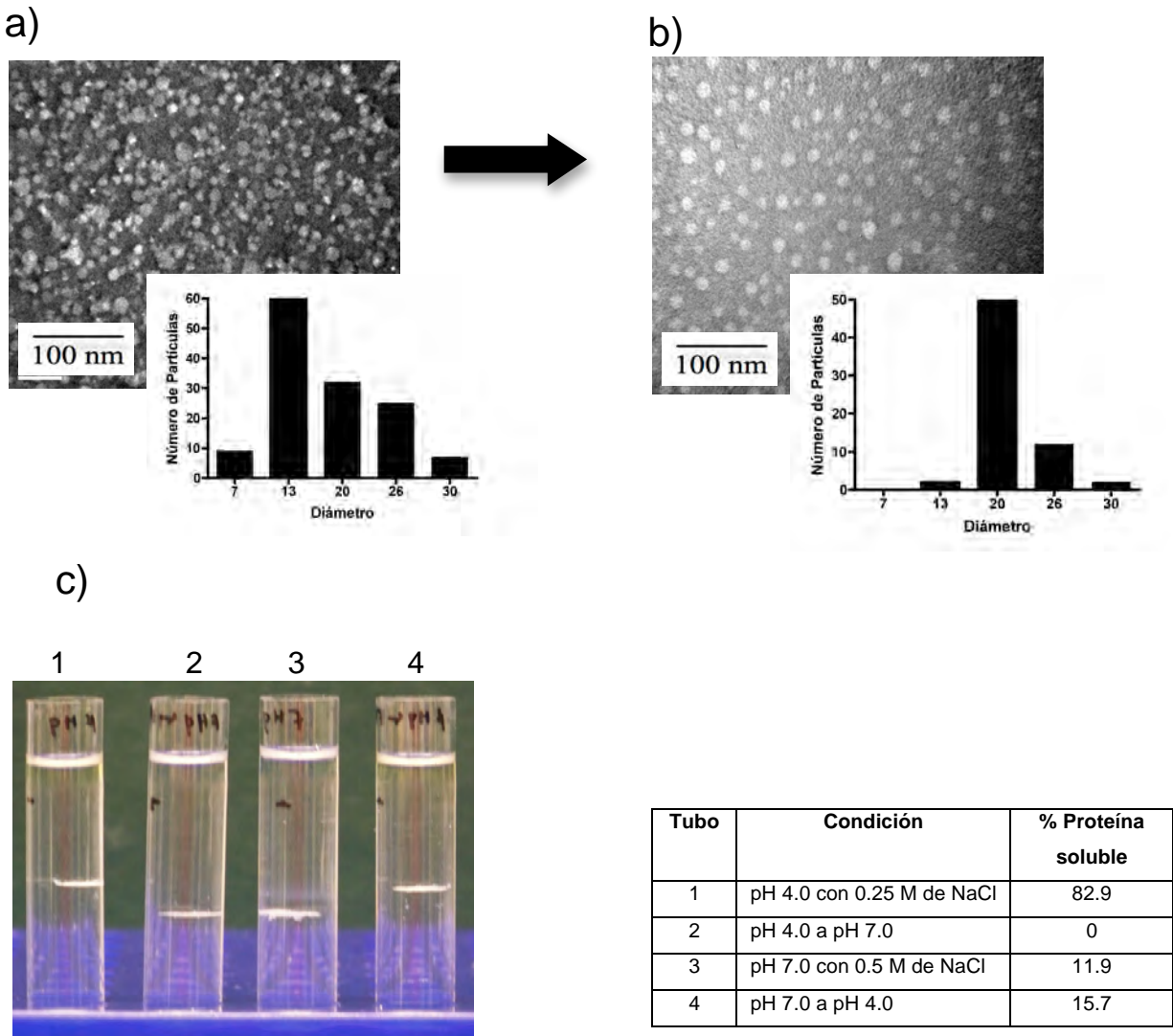
La sal puede modificar la estabilidad estructural de las proteínas principalmente por protección de las interacciones iónicas, que podrían estabilizar o desestabilizar las diferentes distribuciones de carga sobre la superficie de las proteínas (Dominy *et al.*, 2002). También se ha visto que la interacción entre las proteínas de la cápside y el material genético es crítico para un ensamble correcto de las partículas (Aniagyei *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2007). En el caso de las VLPs, la ausencia de la carga negativa de los ácidos nucleicos podría afectar el ensamble correcto de las cápsides. De todas las condiciones de pH y fuerza iónica estudiadas, la diálisis en pH 7.0 con 0.5 M de NaCl fue la condición en la que se lograron identificar partículas más homogéneas. Pero uno de los principales problemas es que precipitan y la presencia de turbidez no permite una buena caracterización mediante la aplicación de técnicas como DLS, AUC o SEC. Las únicas técnicas que se pueden utilizar para caracterizar las muestras son la microscopía y los gradientes de CsCl. En análisis hechos en el dispersor de luz se identificaron agregados con un tamaño entre 200 y 800 nm, que es entre 10 y 40 veces mayor que el tamaño esperado para las VLPs (20-25 nm).

### **6.2.2. Ensamble de las VLPs a partir de los intermediarios formados en pH 4 con 0.25 M de NaCl.**

Se ha demostrado que el tamaño de los poros de algunos virus se puede modificar por cambios en el pH y que otros tienen la capacidad de disociarse y reasociarse (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2010). Al observar que en pH 4 se obtienen principalmente intermediarios de ensamble (oligocapsómeros) se decidió estudiar si es posible favorecer el ensamble de las partículas mediante un incremento del pH de 4.0 a 7.0. Se observó que al hacer el cambio de pH se forma turbidez en muy poco tiempo (~ 5 min) (anexo 9). También se observó un incremento en el tamaño de las partículas (de ~15 nm a 20 nm) y una morfología mas homogénea (Figura 37b). En gradientes de CsCl se observó que al hacer el cambio de pH de 4.0 a 7.0, la banda se desplaza a una densidad similar a la obtenida para la diálisis a pH 7.0 con 0.5 M de NaCl, indicando la formación de las VLPs (Figura 37c). Al hacer un cambio de pH 7.0 a pH 4.0, la banda se desplaza hacia una densidad menor, pero la turbidez no disminuye. Estos resultados



sugieren que es posible el ensamble de las VLPs por un cambio de pH y que el mecanismo es irreversible, indicando la participación de grupos ionizables en la interfase entre los capsómeros. La aparente irreversibilidad sugiere que dichos grupos son atrapados después del ensamble y por consecuencia una disminución del pH no puede cambiar el estado de ionización de las proteínas.

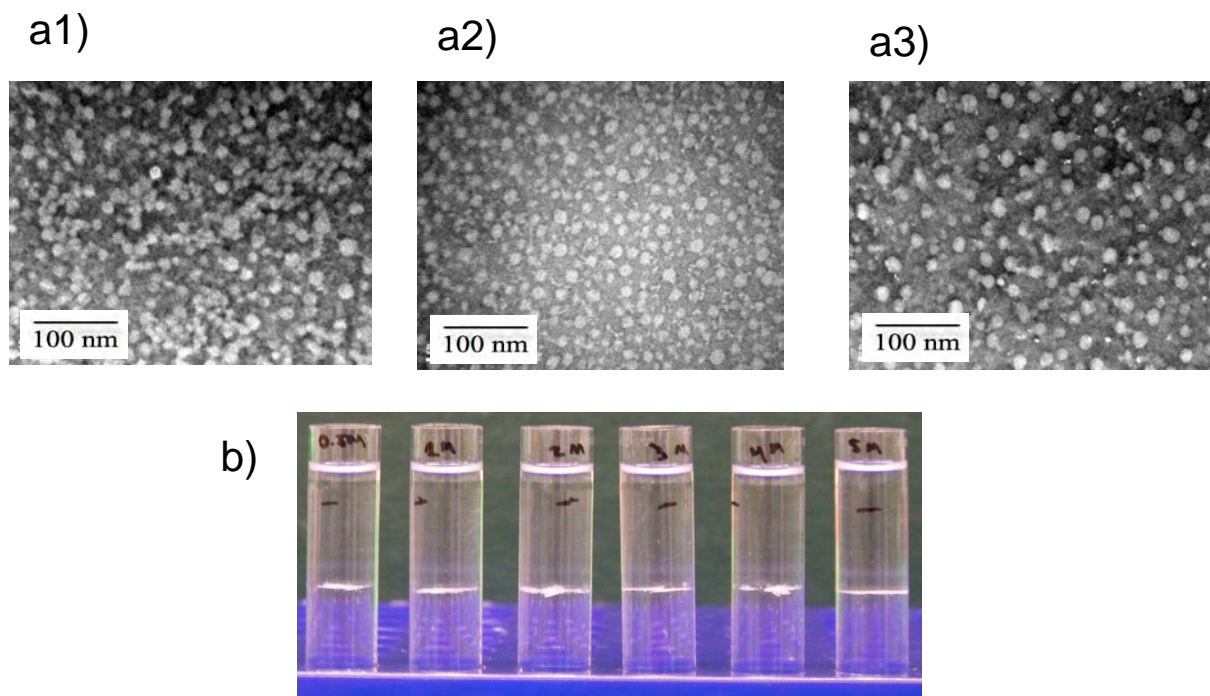


**Figura 37.** Ensamble de las VLPs por cambio de pH 4.0 con 0.25 M de NaCl a pH 7.0 con 0.5 M de NaCl. a) Micrografía de partículas ensambladas en pH 4.0 con 0.25 M de NaCl, b) Micrografía de partículas ensambladas después de hacer el cambio de pH 4.0 a pH 7.0 con 0.5 M de NaCl y c) Gradientes de CsCl de las muestras antes y después del cambio de pH.



### 6.2.3. Efecto de la concentración de GuHCl durante el ensamble de las VLPs.

Se encontró que el ensamble de las VLPs no se afecta por la concentración inicial de GuHCl (Figura 38a). Aunque por microscopía se observó que al disminuir la concentración inicial del agente desnaturante las partículas presentan una mayor agregación. En todas las concentraciones de GuHCl (0 a 5.0 M) estudiadas, los gradientes de CsCl presentaron las mismas bandas (Figura 38b). También se observó que al disminuir la concentración de GuHCl de 5.0 a 0.5 M se comenzó a formar turbidez rápidamente (5 min), sigiriendo que las VLPs se pueden ensamblar por efecto de dilución. Mediante TEM se observaron VLPs con una mayor agregación, si se compara con las VLPs obtenidas por diálisis partiendo de proteína desnaturada en 2.0 o 5.0 M de GuHCl (Figura 38a).

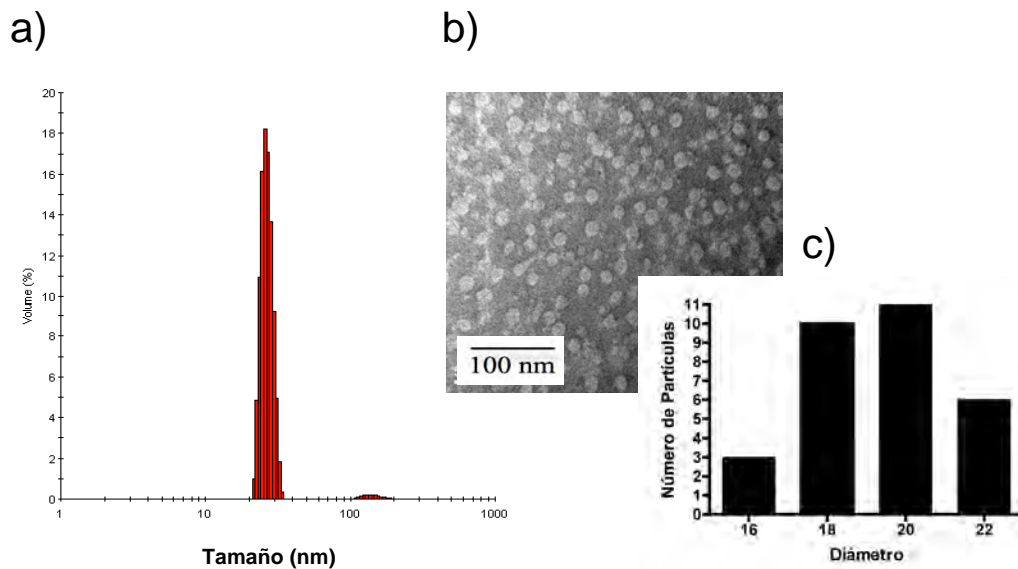


**Figura 38.** Efecto de la concentración inicial de GuHCl en el ensamble de las VLPs. a1) Ensamble directo por efecto de dilución al disminuir la concentración de GuHCl de 5.0 a 0.5 M, con amortiguador pH 7.0 con 0.5 M de NaCl, a2) Ensamble por diálisis en amortiguador pH 7.0 con 0.5 M de NaCl, con la proteína desnaturada en 2.0 M de GuHCl y a3) Ensamble por diálisis en amortiguador pH 7.0 con 0.5 M de NaCl, con la proteína desnaturada en 5.0 M de GuHCl. b) Gradientes de CsCl de muestras ensambladas a diferentes concentraciones de GuHCl (0.5 A 5 M).



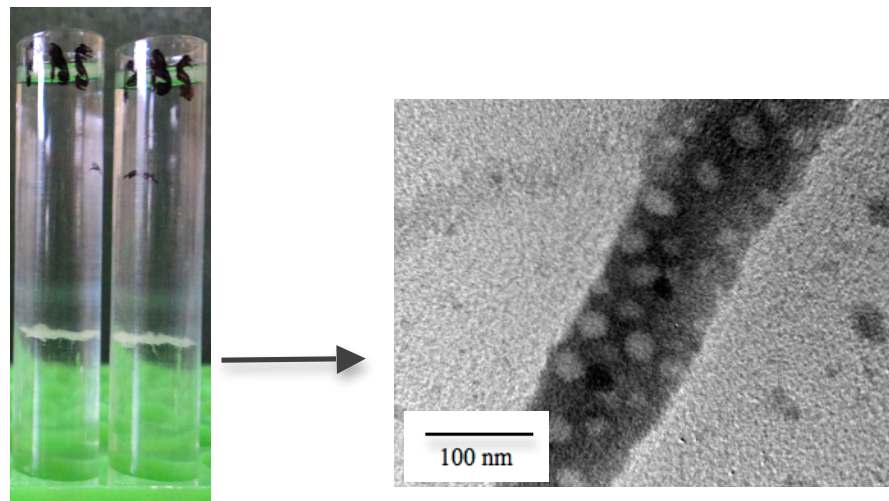
#### 6.2.4. Caracterización de ensamble en amortiguador PBS (pH 7.4).

Al observar que las partículas se ensamblan en pH 7.0, pero que tienden a precipitarse, se decidió estudiar diversas condiciones de diálisis que permitieran incrementar el porcentaje de partículas solubles. Se estudiaron condiciones cercanas a pH 7.0 y algunas reportadas para el ensamble de las VLPs de otros virus (Anexo 15). En ninguna de las condiciones estudiadas se logró un incremento considerable de la proteína soluble (Anexo 10). Debido a lo anterior sólo se decidió realizar una mejor caracterización del ensamble en amortiguador PBS (pH 7.4), ya que si en un futuro se les quiere dar una aplicación biomédica, este es un amortiguador fisiológico. En este caso también casi toda la proteína precipitó, al igual que al hacer la diálisis en pH 7.0 con 0.5 M de NaCl. Por TEM se confirmó que aunque hay formación de turbidez se tiene la presencia de partículas homogéneas con un tamaño entre 18 y 20 nm (Figura 39). Por DLS, se observó que las partículas que se mantienen solubles presentan un diámetro de 23 nm, sugiriendo que una porción de las partículas se agrega y otra porción permanece soluble.



**Figura 39.** Ensamble de las VLPs en amortiguador PBS (pH 7.4). a) Tamaño de las partículas que quedan solubles después de la diálisis, análisis por DLS. b) Micrografía de las partículas obtenidas después de la diálisis, b) Distribución de tamaño de las partículas obtenidas por TEM.

La muestra dializada en PBS también se analizó en gradientes de CsCl (Figura 40). Se observaron dos bandas, una banda mayoritaria y más opaca con una densidad de 1.28 g/mL y otra con una densidad de 1.22 g/mL. Mediante TEM se pudo confirmar la presencia de las VLPs en la banda de mayor densidad (Figura 40). La proteína que se recupera en la banda de menor densidad no se pudo analizar por microscopía ya que para fijar las muestras en las rejillas se necesita eliminar el CsCl por diálisis y esto podría afectar el equilibrio de las especies. Pero mediante DLS se observaron especies de entre 14 y 17 nm de diámetro, que seguramente corresponden a intermediarios de ensamble.



**Figura 40.** Ensamble de las VLPs en amortiguador PBS (pH 7.4). a) Gradiente de CsCl, b) Micrografía de las partículas obtenidas en la banda que presenta una mayor densidad y que corresponde a las VLPs.

### 6.2.5. Efecto de la temperatura en el ensamble de las VLPs.

El proceso de plegamiento de una proteína está gobernado en esencia por las condiciones fisicoquímicas del solvente con el cuál interactúa (pH, temperatura, etc.). En los experimentos previos se decidió utilizar una temperatura baja (4°C) durante el ensamble de las partículas ya que puede reducir la velocidad de procesos indeseables alternos, como la agregación de las proteínas. Se decidió caracterizar también el ensamble de las partículas a 37°C, debido a que el PB19 infecta a humanos, por lo que su ciclo vital se da a esta temperatura, es importante confirmar si también se puede dar el ensamble *in vitro* bajo esta condición de temperatura. Se hizo una comparación del



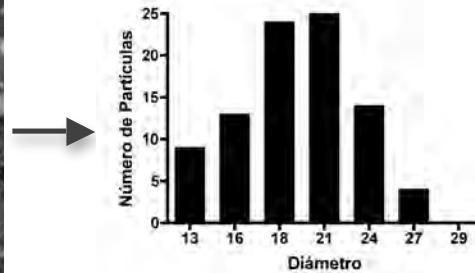
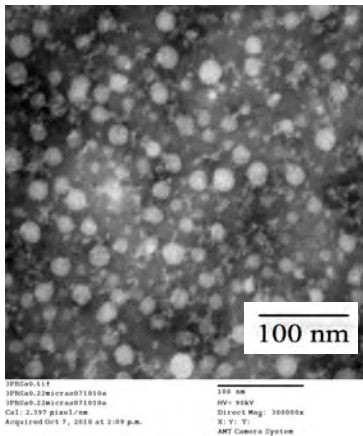


ensamble en amortiguador PBS a 4 y a 37°C y también cuando se lleva a cabo el ensamble en pH 4.0 con 0 M de NaCl a 4°C, ya que es cuando se obtiene un alto porcentaje de proteína soluble (Figura 41). Se hicieron análisis por TEM, DLS, el porcentaje de proteína soluble y el porcentaje de proteína que se recupera en cada una de las bandas del gradiente de CsCl.

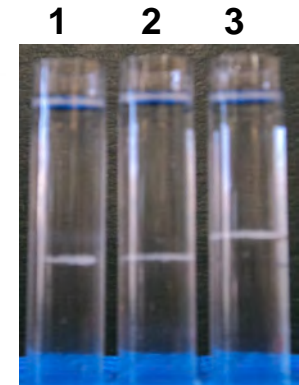
a)

Muestra	% Proteína soluble 2 micras	% Proteína soluble 0.22 micras	% Proteína CsCl banda 1	% Proteína CsCl banda 2	Tamaño (nm) TEM	Tamaño nm DLS
PBS, 4°C	84.02±5.4	32.90±2.6	50.85±3.9	24.45±3.3	20-25	23.38±6.8
PBS, 37°C	66.60±0.6	3.24±0.3	57.03±0.8	---	19-25	20.49±1.4
pH 4.0, 0 M NaCl, 4°C	95.01	83.98	61.25	---	ND	15.32±0.9

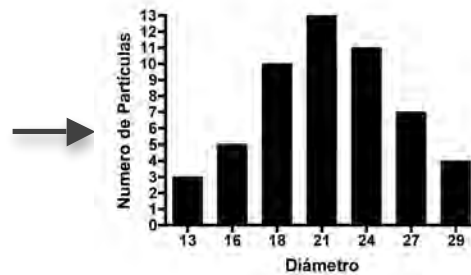
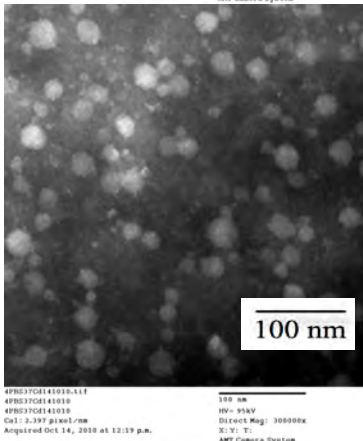
b)



d)



c)



**Figura 41.** Efecto de la temperatura en el ensamble de las VLPs mediante diálisis en amortiguador PBS. a) Tabla mostrando el porcentaje de proteína soluble, el rendimiento de proteína después del gradiente de CsCl y el tamaño de las partículas obtenido por TEM y DLS. Micrografías de las partículas solubles ensambladas en PBS a 4°C (b) y a 37°C (c). En ambos casos las muestras analizadas corresponden a la proteína recuperada después de la microfiltración con membrana de 0.22 µm. d) Análisis por gradientes de CsCl de las partículas ensambladas en 1) PBS, 4°C, 2) PBS, 37°C y 3) pH 4.0 con NaCl 0.25 M, 4°C.

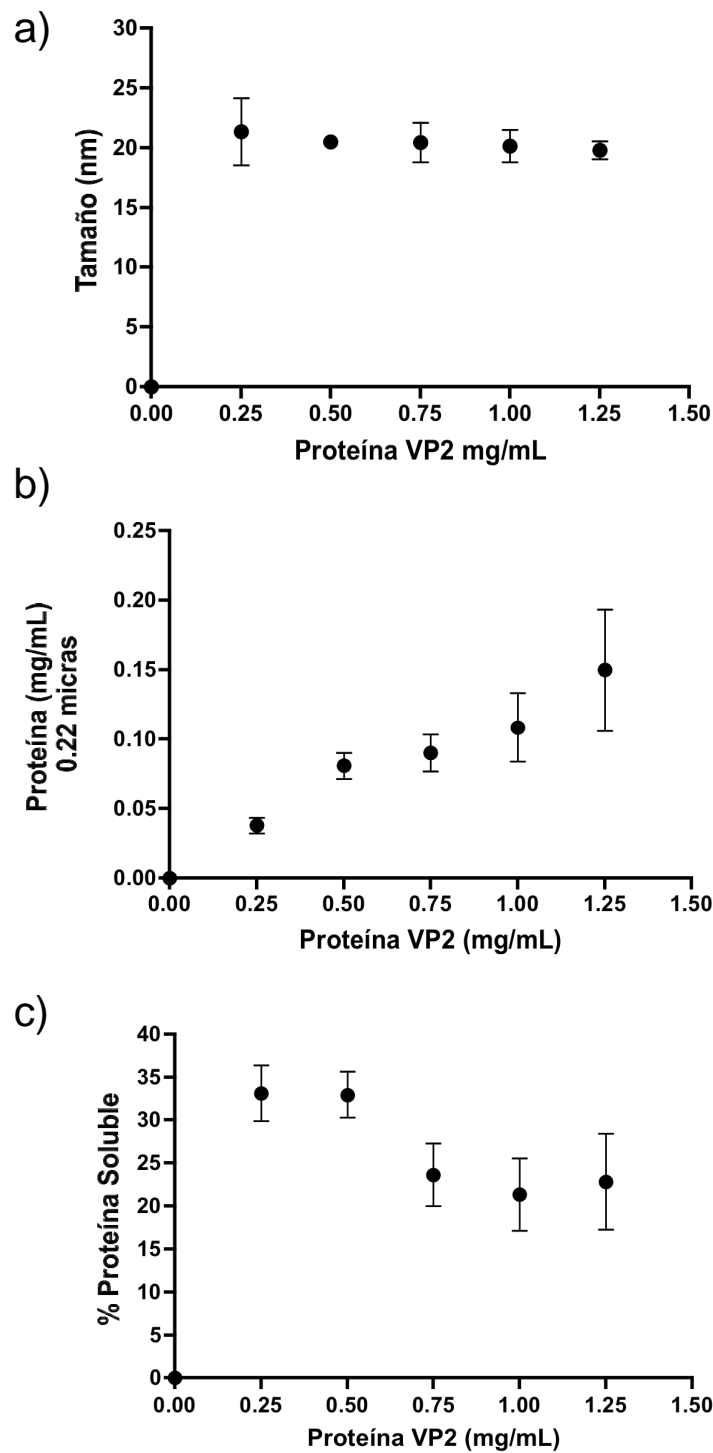


En pH 4.0 con baja fuerza iónica, el porcentaje de proteína soluble es muy alto comparado con el que se obtiene en amortiguador PBS, pero sólo se da el ensamble de oligocapsómeros con un tamaño entre 13-15 nm y una densidad de 1.22 g/mL (Figura 41a). Al hacer el ensamble en amortiguador PBS la proteína se agrega, pero el efecto es mas significativo al incrementar la temperatura de diálisis de 4 a 37°C. Mediante TEM y DLS, se observó la presencia de partículas con un diámetro entre 20 y 25 nm en ambas muestras, después de microfiltrar con cartuchos de 0.22 µm (Figura 41a). En las micrografías se puede observar que hay una mayor proporción de VLPs al hacer el ensamble a 4°C, ya que bajo estas condiciones de diálisis se recupera alrededor de un 32% de proteína soluble, por lo que hay una mayor concentración de partículas en la muestra, mientras que a 37°C sólo se recupera un 3% (Figura 41b y 41c). Al analizar ambas muestras por gradientes de CsCl se observó que la muestra dializada a 4°C presenta dos bandas, la de los intermediarios (25%) y la de las VLPs (51%) (Figura 41d). En la muestra dializada a 37°C solo aparece la banda de mayor densidad con un 57% de la proteína total. En ambas temperaturas el rendimiento de ensamble es alrededor del 50%, pero la proteína queda mas agregada a 37°C. Esta agregación sugiere que así como se dan interacciones dependientes del pH, también pueden ocurrir interacciones hidrofóbicas entre las proteínas. Las interacciones dependientes del pH podrían estar relacionadas principalmente con la asociación entre capsómeros y por otro lado ciertas interacciones entrópicas se podrían dar principalmente ente VLPs, provocando la precipitación de las partículas, haciendo que su comportamiento sea coloidal. De acuerdo a los resultados obtenidos consideramos que la mejor condición para llevar a cabo el ensamble de las VLPs es utilizando una temperatura de 4°C en PBS (pH 7.4).

#### **6.2.6. Efecto de la concentración de proteína durante el ensamble.**

La concentración inicial de proteína, podría tener un efecto sobre la agregación de las partículas durante el proceso de ensamble. Debido a esto, se estudiaron diferentes concentraciones de proteína durante el ensamble de las partículas (0.25 a 1.5 mg/mL). Se observó que independientemente de la concentración inicial de proteína, las partículas presentaron un tamaño entre 20 y 23 nm de diámetro (Figura 42).





**Figura 42.** Efecto de la concentración de proteína en el ensamble de las VLPs en amortiguador PBS (pH 7.4). a) Tamaño de las partículas, después de microfiltrar las muestras con cartuchos de 0.22  $\mu\text{m}$  (análisis por DLS); b) Concentración de la proteína soluble recuperada después de microfiltrar las muestras con cartuchos de 0.22  $\mu\text{m}$ , c) Porcentaje de proteína soluble que se recupera después de microfiltrar las muestras con cartuchos de 0.22  $\mu\text{m}$  (se hace una correlación con la proteína total inicial antes de microfiltrar).



Al incrementar la concentración de proteína, se recuperó una mayor cantidad de proteína soluble, pero en todas las muestras se formó turbidez (Figura 42b). A concentraciones mayores de 0.5 mg/mL, el porcentaje de proteína soluble (después de microfiltrar las muestras) disminuyó considerablemente, posiblemente los agregados formados son de mayor tamaño y se deban a un mal plegamiento de la proteína (Figura 42c). También se realizó el ensamble a 0.1 mg/mL proteína, pero tampoco se evitó la formación de turbidez por lo que es posible que la precipitación de las partículas se deba a que el punto isoeléctrico de la proteína VP2 es de 6.5 y está muy cercano a las condiciones óptimas encontradas para el ensamble de las partículas (pH 7.4).

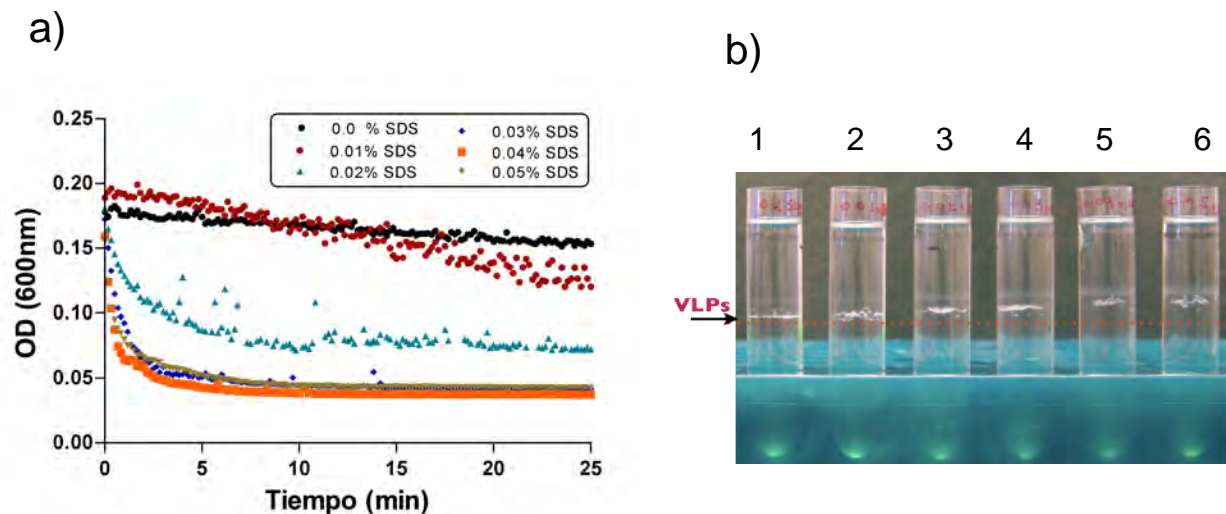
### **6.3. Estabilidad de las VLPs.**

#### **6.3.1. Efecto del SDS en la desagregación y desensamble de las VLPs.**

Con el objetivo de eliminar la agregación de las partículas que se obtienen al realizar la diálisis en amortiguador PBS, se estudió el efecto de diferentes compuestos (glicerol,  $\text{CaCl}_2$ , ácido cítrico, DTT, SDS, Tween-20, Tritón X-100, C12, TAB). De todos los aditivos estudiados el SDS fue el único que ayudó a eliminar la turbidez de las muestras. Debido a esto, se realizó un estudio más detallado del efecto del SDS en la desagregación y desensamble de las partículas. El SDS (dodecilsulfato sódico,  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$ ) es un tensoactivo aniónico. Su solubilidad depende de la concentración micelar crítica (CMC), por arriba de este valor las moléculas tienden a asociarse a través de sus cadenas hidrofóbicas formando micelas, generalmente con un interior hidrofóbico y un exterior hidrofílico expuesto a las moléculas de agua (Anexo 11). Las micelas generalmente se representan como esferas simétricas, pero mediante simulaciones se ha demostrado que presentan forma irregular y que son dinámicas. La formación de micelas se puede desplazar a más altas concentraciones de tensoactivo en la presencia de proteínas, ya que pueden interactuar disminuyendo la concentración de monómeros libres. Sin embargo las proteínas también pueden interactuar con el tensoactivo formando micelas tipo “clusters” en las que las proteínas quedan en el interior. La CMC es la característica mas importante que se debe de conocer de un tensoactivo, ya que la interacción de las proteínas es muy diferente cuando se encuentra en forma monomérica o formando micelas.



Primero se realizó un estudio cinético de pérdida de turbidez (siguiendo la disminución en la absorbancia a 600 nm), al exponer las partículas agregadas a diferentes concentraciones de SDS (0.01 a 0.05% y que corresponde a un aconcentración de 0.36 a 1.7 mM). Se encontró que se necesitan concentraciones muy bajas de SDS para eliminar la turbidez de la muestra (~ 0.03%) y también tiempos muy cortos (~5 min) (Figura 43a). Mediante gradientes de CsCl se observó cómo se disminuye la densidad de las partículas al exponerlas a las diferentes concentraciones de SDS (Figura 43b). Estos resultados sugieren que las partículas expuestas a este detergente se desagregan, pero también se disocian en partículas de menor tamaño que el de las VLPs.

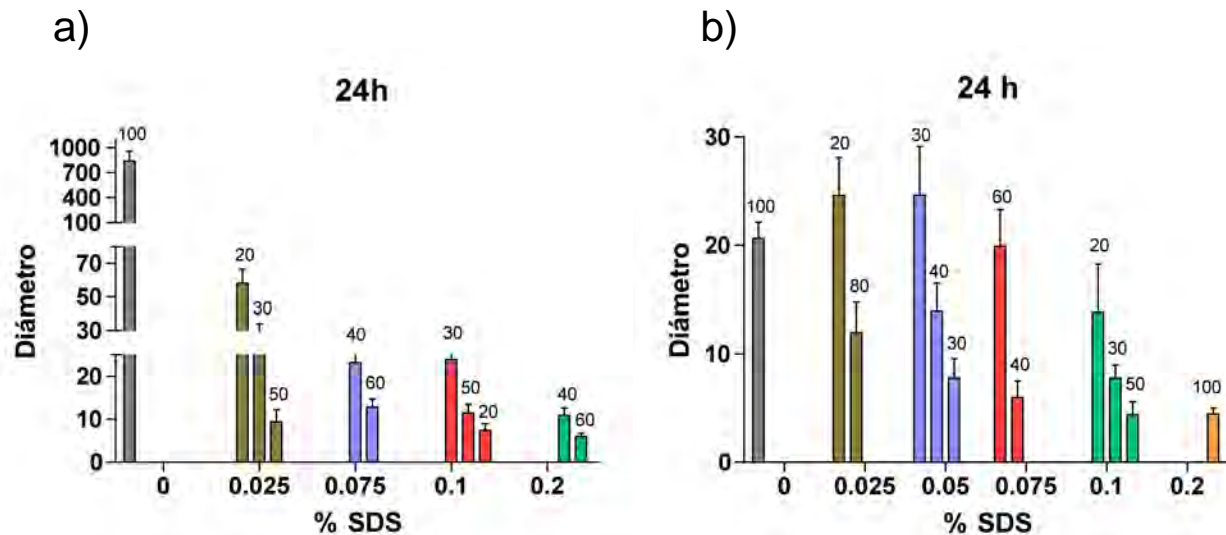


**Figura 43.** Efecto de la concentración de SDS en la desagregación y desensamble de las VLPs. a) Pérdida de turbidez en función de la concentración de SDS. b) Gradientes de CsCl de las muestras expuestas a diferentes concentraciones de SDS, 1) 0%, 2) 0.01%, 3) 0.02%, 4) 0.03%, 5) 0.04% y 6) 0.05%.

Mediante DLS, se siguió la distribución de tamaño de las partículas después de exponerlas a diferentes concentraciones de SDS (0, 0.025, 0.050, 0.075, 0.10 y 0.20%) en función del tiempo (15 min, 2, 4 y 24 h). Se analizaron muestras de 300  $\mu$ L



microfiltradas con cartuchos de 0.22  $\mu\text{m}$  (partículas solubles) y también muestras sin microfiltrar (partículas agregadas), después de exponerlas al detergente. En la Figura 44 se presentan los resultados obtenidos a las 24 h de exposición al SDS.



**Figura 44.** Análisis por dispersión de luz del efecto de la concentración de SDS en la desagregación y desensamble de las VLPs obtenidas por diálisis en amortiguador PBS. a) VLPs agregadas (muestra sin microfiltrar, diálisis directa) y b) VLPs solubles (muestras microfiltradas con 0.22  $\mu\text{m}$ ). Los números arriba de las barras corresponden al porcentaje de cada una de las especies presentes en cada una de las muestras.


Se encontró que al exponer las partículas al SDS, su tamaño comienza a disminuir en tiempos muy cortos. Se observó la presencia de diversas especies, en función del estado de agregación de las partículas y de la cantidad de proteína presente en la muestra. Fue mayor el efecto del SDS en las muestras que contienen sólo partículas solubles, por ejemplo a las 24h con 0.025% de SDS, un 20% de las partículas mantiene su tamaño (18-25 nm) y un 80% se disocia a especies de entre 10 a 12 nm, mientras que con 0.2% de SDS todas las partículas se disocian a una especie de  $\sim 4$  nm de diámetro, que posiblemente corresponde a la proteína VP2-His en forma monomérica (Figura 44b). En el caso de las muestras sin microfiltrar y que contienen las partículas agregadas se observó que con un 0.025% de SDS no se pierde por



completo la turbidez, pero si se disminuye el tamaño de los agregados, un 20% presentó 50 nm de diámetro, un 30% un tamaño entre 20 y 30 nm y sólo un 50% se disocia a especies de entre 10 y 12 nm. Al incrementar la concentración de SDS a 0.2%, las partículas se disocian, pero no se obtiene una especie homogénea, un 40% presentó un tamaño de entre 10 y 12 nm y un 60% presentó un tamaño entre 4 y 5 nm de diámetro (Figura 44b). La CMC de los tensoactivos depende de la fuerza iónica del medio, ya que su incremento reduce la repulsión electrostática entre los grupos iónicos de la cabeza polar. Para el SDS la CMC es de 7.0-8.0 mM en agua, mientras que en amortiguador PBS es de 0.8-1.0 mM. Esto indica que en nuestros experimentos el SDS se encuentra en forma de micelas y que en esta conformación interactúa con las partículas provocando la pérdida de turbidez y su disociación.

Al observar que mediante la adición de SDS se puede eliminar la turbidez y que se provoca la disociación de las partículas, se decidió estudiar cuál es el efecto de este tensoactivo en la estructura secundaria de la proteína. Se realizaron análisis por dicroísmo circular de 3 muestras, 1) Las partículas solubles que se obtienen al hacer el ensamble en amortiguador PBS, 2) Los oligocapsómeros obtenidos al hacer el ensamble en amortiguador de acetatos pH 4 y 3) Las partículas agregadas que se obtienen al hacer el ensamble en PBS, después de exponerlas a 0.05% de SDS. En la figura 45 se puede observar que las partículas solubles que se obtienen en amortiguador PBS y los oligocapsómeros obtenidos en pH 4.0, presentaron un espectro muy similar, el cual correlaciona con proteína que presentan estructura  $\alpha+\beta$ , ya que muestra dos bandas negativas una a 220 nm y otra entre 208 y 210 nm. También se ha observado que para estas proteínas, la banda entre 208 y 210 nm presenta una mayor intensidad que la banda a 222 nm (Manavalan y Johnson, 1983). Los resultados obtenidos por dicroísmo circular concuerdan con la estructura secundaria reportada para la proteína VP2, ya que se conforma principalmente de 8 hojas  $\beta$  antiparalelas, una hélice- $\alpha$  y de varias asas (Kauffman *et al.*, 2004) (Figura 45c). También se ha reportado un espectro muy similar para las VLPs del parvovirus canino, las cuales también presentan principalmente estructura  $\beta$  (Carreira *et al.*, 2004) (Anexo 13a). Los resultados obtenidos por DC nos permiten confirmar que durante el ensamble se tiene

---



un buen plegamiento de la proteína. En otro estudio también se observó un comportamiento muy similar y corresponde al ensamble de las VLPs del virus HPV16 E7, ya que cuando la proteína E7 se encuentra en forma de dímeros hay un mínimo entre 202 y 204 nm y cuando los dímeros se asocian para formar oligómeros este mínimo desaparece y se obtiene un espectro mostrando principalmente estructura  $\beta$  (Alonso *et al.*, 2004) (Anexo 13b).

En la figura 45a también se puede observar que el espectro de las VLPs agregadas ensambladas en PBS y que fueron expuestas a 0.05% de SDS, sólo presenta ligeros cambios con respecto al espectro de las partículas que no fueron expuestas al detergente, por ejemplo aparece un pico entre 205 y 208 nm, que podría relacionarse con una mayor exposición de las asas de las subunidades de la proteína VP2-His al disociarse las partículas. Cambios muy similares a los que encontramos fueron reportados para el virus PyVP1 y que fueron atribuidos a un incremento en la proporción de hélices  $\alpha$  después de la exposición al detergente (Yang y Teng, 1999) (Anexo 13c). Se ha demostrado que el SDS estabiliza y favorece la conformación de hélice  $\alpha$  en una amplia variedad de péptidos y proteínas. Mediante el programa CD pro se hizo una estimación del contenido de estructura secundaria que presentan las partículas antes y después de exponerlas al SDS y se confirmó una disminución drástica del porcentaje de hojas  $\beta$  (de 41% a 6%), que fue compensada con un incremento en la proporción de hélices  $\alpha$  (de 3.4 a 48%) (Figura 46b). Yang y Teng sugirieron que la interacción entre PyVP1 y el SDS está gobernada principalmente por las interacciones electrostáticas del tensoactivo aniónico con los residuos de aminoácidos que presentan carga positiva y también sugirieron un efecto más drástico al utilizar el SDS a una concentración en la que se encuentra en forma de micelas, provocando un incremento de estructura  $\alpha$ .

La interacción de los tensoactivos iónicos con las proteínas es muy compleja, procede en diversas etapas y como se explicó anteriormente depende si se encuentra en forma monomérica o de micelas. El SDS puede interaccionar a partir de su grupo

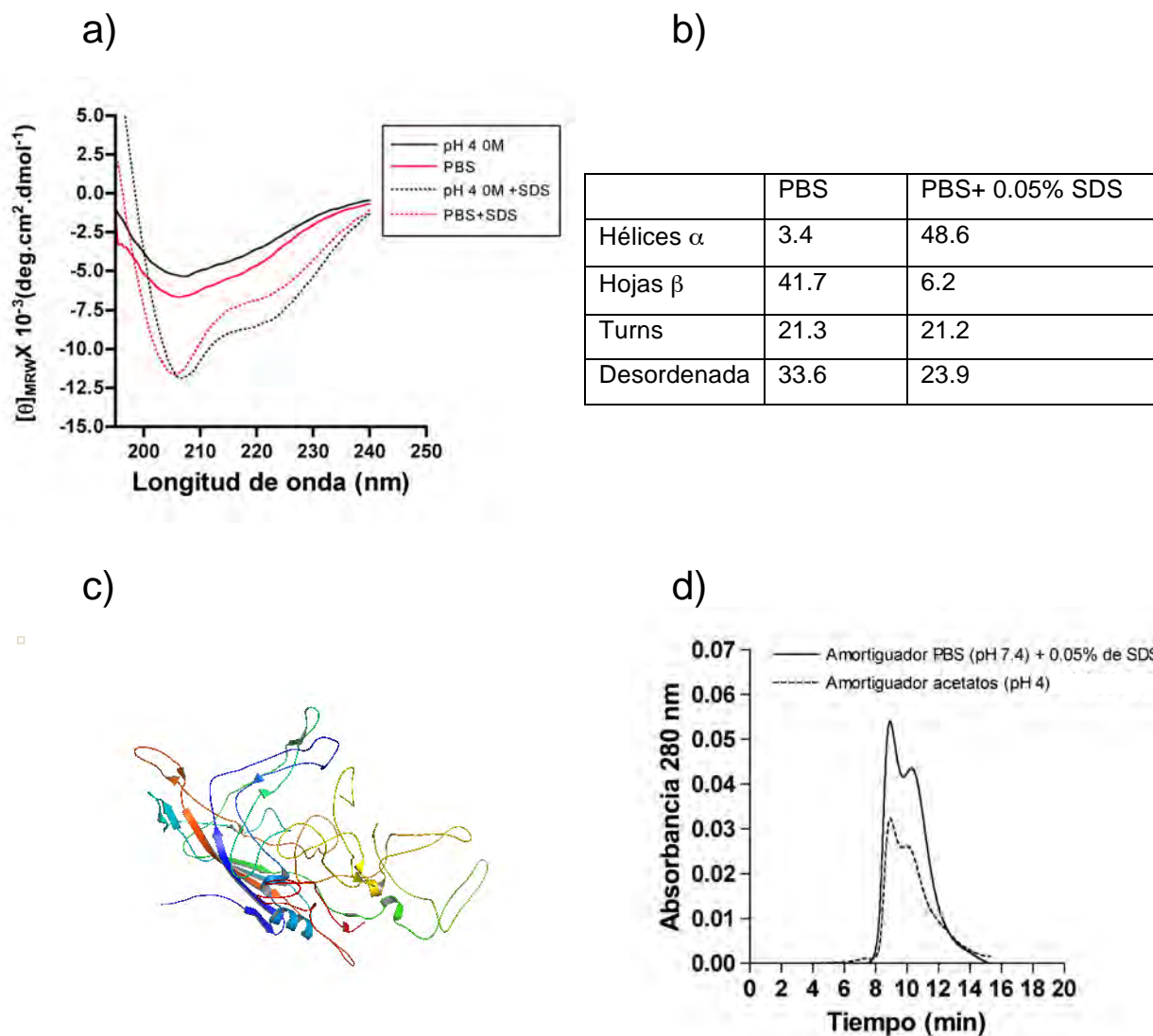


---

sulfato con residuos de aminoácidos cargados positivamente como la lisina, arginina e histidina y por otro lado la cadena alquilada puede interactuar con las regiones hidrofóbicas de la proteína. Cuando los sitios de interacción directa con la proteína se han saturado, la unión de más moléculas de tensoactivo puede llevar a la formación de clusters y así comenzar el desplegamiento de las proteínas. Estos clusters pueden ser estabilizados por la asociación de varias moléculas de proteína, llevando a la formación de pequeños complejos de proteínas o micelas compartidas. Si se incrementa más la concentración, se podría favorecer la formación de clusters con proteínas individuales. La cuestión de si los monómeros o las micelas despliegan a las proteínas no puede responderse tan fácilmente. Por arriba de la CMC es muy complicado seguir los cambios en el equilibrio de los complejos de proteína-tensoactivo que se estén formando. Por otro lado también se ha reportado que algunas proteínas son resistentes a desnaturalización por SDS, por ejemplo la pepsina, la glucosa oxidasa y la catalasa. Esto no implica que las proteínas no puedan interactuar con el SDS completamente, seguramente se debe a una alta rigidez del estado nativo, la cual se da generalmente en proteínas con alto contenido de estructura  $\beta$  y también en proteínas oligoméricas, como es nuestro caso (Otzen, 2011).

Algo interesante es que las partículas solubles que se ensamblan en PBS y los oligocapsómeros que se obtienen al dializar en pH 4.0 presentan una estructura secundaria muy similar. Cuando ambas muestras se exponen a SDS aparece el mínimo entre 205 y 208 nm, sugiriendo que se llega a especies muy similares (Anexo 12). Mediante SEC, en ambas muestras, se observaron dos picos con los mismos tiempos de retención, esto concuerda con los resultados de dicróismo, apoyando la idea de que en ambas condiciones se llega a las mismas especies (Figura 46d). Los resultados obtenidos por dicróismo circular sugieren que la turbidez presente en las muestras dializadas en PBS o pH neutro se debe a la agregación de las VLPs después del ensamble y no a la presencia de agregados de proteína mal plegada, ya que tanto para las VLPs solubles como para las VLPs agregadas se llega a una estructura secundaria muy similar después de adicionar el SDS (Figura 46).

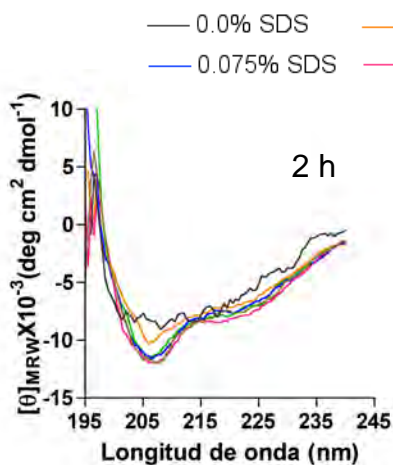




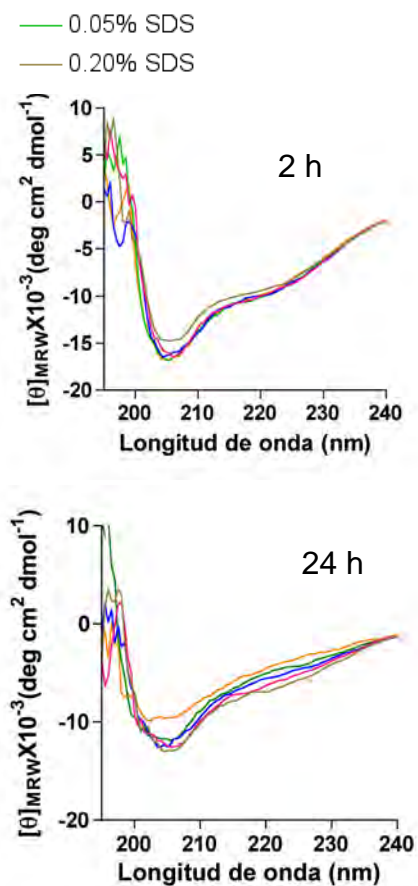
**Figura 46.** a) Espectros de dicroísmo circular de las partículas solubles obtenidas en PBS, de las intermediarios obtenidos en pH 4.0 y de las partículas agregadas obtenidas en PBS, después de su disociación por exposición a 0.05% de SDS, así como de los intermediarios obtenidos en pH 4 después de exponerlos a 0.05% de SDS. b) Estimación del contenido de estructura secundaria con el programa CD pro. c) Estructura secundaria reportada para la proteína VP2 (Kaukmann *et al*, 2004). d) Perfil de elución en la columna superdex 200 de los intermediarios obtenidos a pH 4.0 con 0 M de NaCl y de las partículas obtenidas en PBS después de ser disociadas por efecto del SDS.

Por último se hicieron análisis por dicroísmo circular de las partículas agregadas y de las partículas solubles al exponerlas a diferentes concentraciones de SDS (0.025% a 0.2%) en diferentes tiempos (2 a 24 h) (Figura 46).

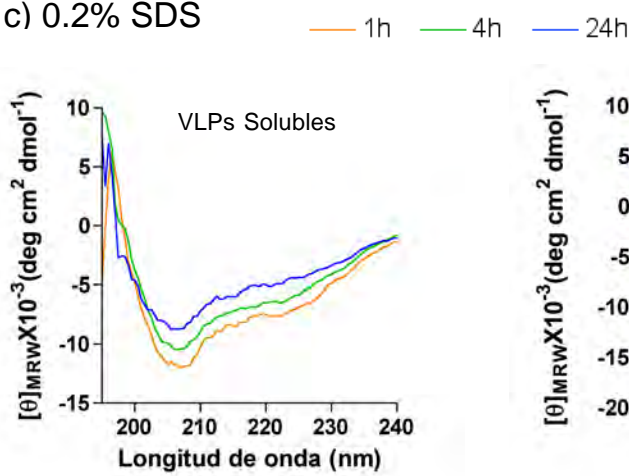
a) VLPs solubles



b) VLPs agregadas



c) 0.2% SDS



**Figura 46.** Efecto del SDS en la estructura secundaria de las VLPs. a) VLPs solubles (0.1-0.15 mg/mL de proteína)(muestra microfiltrada con membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ ), b) VLPs agregadas (0.3-0.4 mg/mL de proteína) (muestra sin microfiltrar, diálisis directa); cada una de las líneas corresponde a una concentración diferente de SDS, c) Efecto del SDS (0.2%) en función del tiempo de exposición; cada línea corresponde a un tiempo diferente.



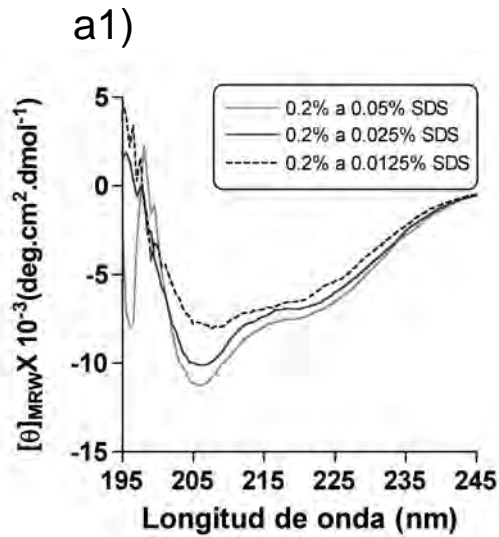
Como se puede observar en la figura 46a y 46b, los espectros presentaron el mismo comportamiento independientemente de la concentración de SDS a la que se hayan expuesto las partículas. El principal efecto del tensoactivo sobre la estructura es que se incrementa el pico entre 208 y 210 nm y como se explicó anteriormente se podría relacionar con un incremento en la cantidad de estructura hélice. Al estudiar el efecto del SDS en función del tiempo de exposición, sólo se observó una ligera pérdida de estructura secundaria al incrementar el tiempo de 2 a 24 h. Podemos concluir que el SDS provoca la desagregación y disociación de las partículas sin una pérdida total de la estructura. El efecto de este tensoactivo sobre la proteína VP2 es compleja ya que al parecer provoca un cambio de estructuración favoreciendo la formación de hélices y este efecto es independiente de la concentración SDS.

### **6.3.2. Re-ensamble de las VLPs por eliminación del SDS.**

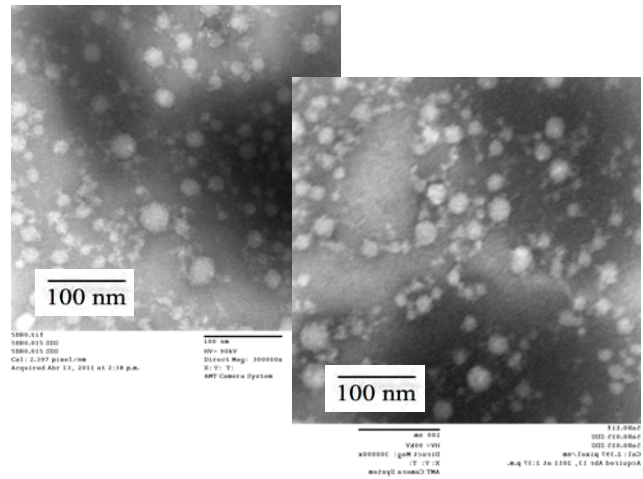
Algo interesante fue demostrar que se puede llevar a cabo la reasociación de las partículas mediante la eliminación del SDS por diálisis. Para dicho fin las muestras expuestas durante 1 h a 0.05% de SDS (microfiltradas y sin microfiltrar) se pusieron a dializar en amortiguador PBS durante 36 h. Mediante DLS, se observó un aumento en el tamaño de las partículas después de la eliminación del SDS (Anexo 14). Antes de la diálisis, en la muestra microfiltrada (sólo VLPs solubles) se tenían partículas con un tamaño entre 7 y 15 nm y después de la remoción del SDS se observaron partículas con un diámetro entre 25 y 35 nm. Para la muestra sin microfiltrar (VLPs agregadas) después de la eliminación del SDS se obtuvieron especies de 25 y 70 nm. Por microscopía electrónica se pudo confirmar que se lleva a cabo el re-ensamble de las partículas al remover el SDS, pero el tamaño es heterogéneo y también se observó la presencia de algunos agregados amorfos con tamaños entre 20 y 100 nm (Anexo 14). Después de la remoción del SDS no se volvió a formar turbidez, pero es posible que esto se deba a que no se haya logrado remover todo el SDS de las muestras. Este resultado es interesante ya que de esta forma se podría eliminar la turbidez y precipitación de las partículas y por lo tanto obtener un mayor rendimiento de partículas completamente solubles.



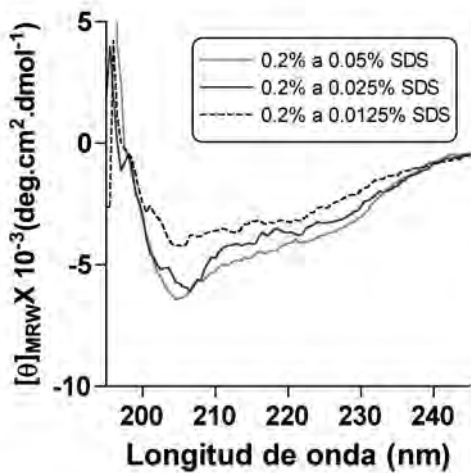
Para completar el estudio de reasociación de las VLPs, se llevó a cabo la remoción del SDS a concentraciones específicas. Las VLPs primero por exposición a 0.2% de SDS durante 24 h y posteriormente se pusieron a dializar en concentraciones específicas de SDS (0.0125, 0.025 y 0.050% de SDS). Las muestras se analizaron por DLS, CD y también por TEM (Figura 47).



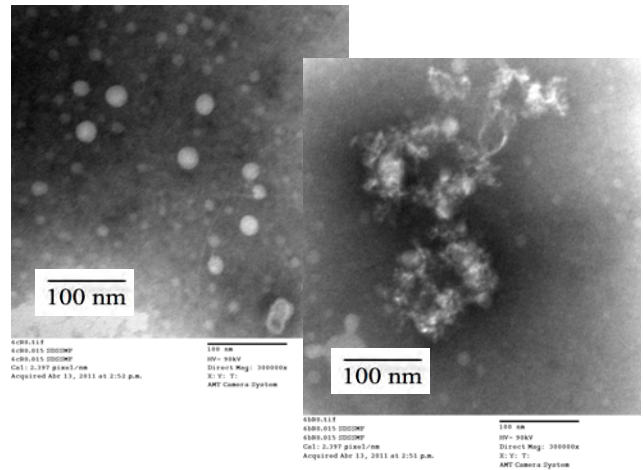
b1)



a2)



b2)



**Figura 47.** Re-ensamble de las VLPs por remoción de SDS. a) Espectros de dicroísmo circular después de la eliminación del SDS, partiendo de partículas agregadas (a1) y completamente solubles (a2). b) Micrografías obtenidas después de la remoción del SDS de 0.200% a 0.015%, partiendo de partículas agregadas (b1) y completamente solubles (b2). Al bajar la concentración de SDS a 0.015%, las muestras presentaron turbidez.



Se observó que al bajar la concentración de SDS a 0.0125 % se vuelve a formar turbidez en las muestras, indicando la formación de agregados. Las muestras dializadas en una concentración de SDS mayor a 0.025% ya no presentaron turbidez, sugiriendo que no se obtiene una reasociación completa de las VLPs. Los resultados por DLS presentaron mucha variabilidad, pero por CD se observó que al disminuir la concentración de SDS, la proteína vuelve a presentar mayor estructura  $\beta$ . Por TEM se observó que el tamaño de las partículas es muy heterogéneo y también se observó la presencia de varios agregados amorfos (Figura 47).

El SDS es generalmente usado para desplegar proteínas irreversiblemente, ya que aunque se une reversiblemente a las proteínas es muy difícil su eliminación debido a su alta afinidad por las mismas. La diálisis es un proceso muy lento para la remoción del SDS debido a que las micelas son demasiado grandes para migrar a través de la membrana semi-permeable. La presencia de micelas también puede interferir con el proceso de replegamiento. Para una rápida remoción se ha propuesto utilizar ciclodextrina, que tiene la capacidad de complejarse en cuestión de milisegundos con el SDS. Este proceso ha sido utilizado para evitar la agregación durante el replegamiento, la proteína es primero transferida a SDS y la ciclodextrina es entonces adicionada para remover el SDS, favoreciendo el plegamiento de la proteína (Otzen, 2010). En nuestro caso, durante la eliminación del SDS por diálisis, se pierde o disminuye la eficiencia de ensamble de las partículas, por lo que finalmente no fue un buen camino para intentar recuperar partículas homogéneas y para poder evitar su agregación.

### **6.3.3. Efecto de la Urea y del GuHCl en la desagregación y desensamble de las VLPs.**

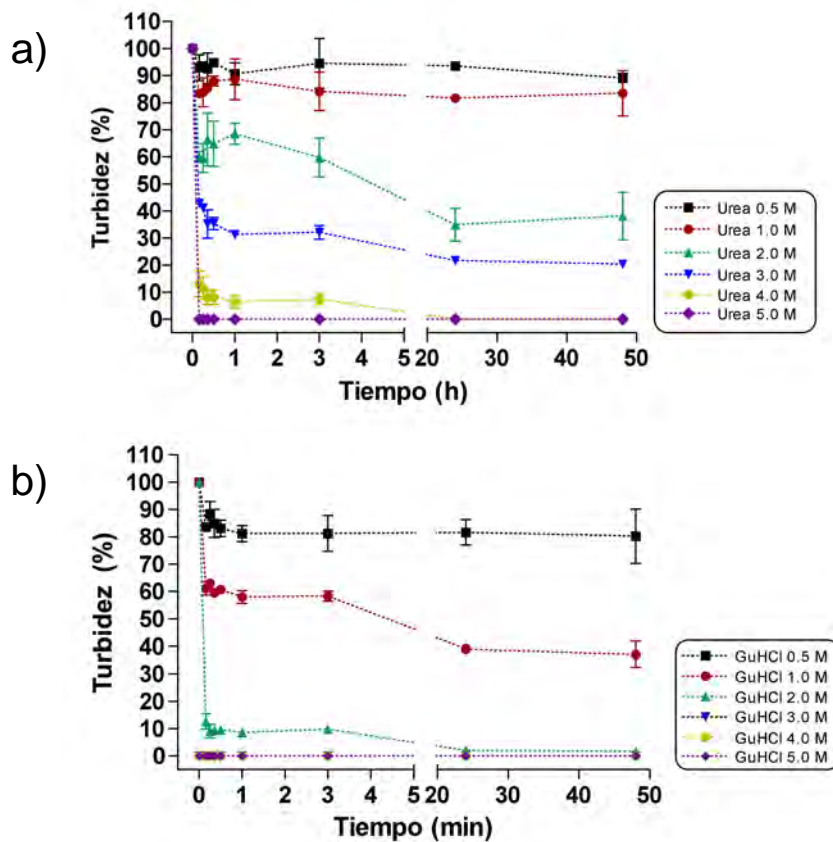
Diversos agentes desnaturalizantes han sido empleados para estudiar la estabilidad de las cápsidas virales. Colomar *et al.* (1993) reportaron una técnica para la disociación del virus SM40 mediante la ruptura de los puentes disulfuro y la alteración del contenido de calcio, con el uso de DTT y EGTA. Yang y Teng (1998) demostraron un desplegamiento irreversible de la proteína VP1 del poliomavirus por efecto del GuHCl. Un comportamiento similar fue observado para las VLPs del virus de las Hepatitis B





(HBcAg), las cuales pueden ser disociadas dentro de dos especies con tamaños de 6 y de <1 nm de diámetro. La especie de 6 nm se cree que es el precursor de la asociación de las VLPs (35 nm), mientras que la especie con menos de 1 nm corresponde a la proteína HBcAg completamente desnaturalizada, la cual pierde sus propiedades de ensamble. El GuHCl y la urea exhibieron una desnaturalización irreversible a concentraciones arriba de 3.0 y 4.0 M, respectivamente. Por otro lado 2.5 M de urea no afecta las propiedades de ensamble de las partículas, aunque provoca su disociación a partículas de 6 nm de diámetro (Lee y Tan, 2008).

Se decidió estudiar el efecto de la urea y del GuHCl en la desagregación y disociación de las partículas, para posteriormente comparar con el efecto del SDS. Primero se estudió la disminución de turbidez en función de la concentración de estos dos agentes caotrópicos (Figura 48).

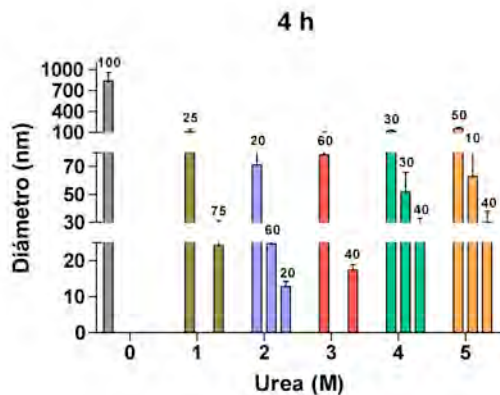


**Figura 48.** Efecto de la concentración de la urea y GuHCl en la desagregación y desensamble de las VLPs. a) Pérdida de turbidez en función de la concentración de urea (a) y GuHCl (b).

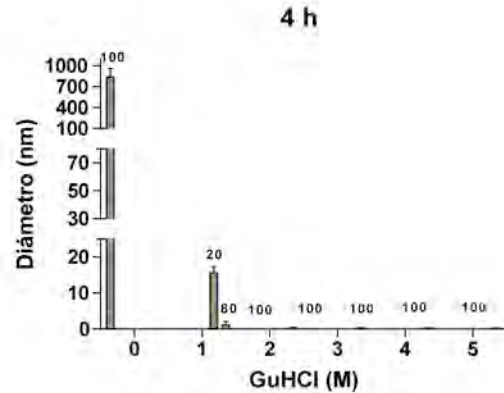


El GuHCl presentó un mayor efecto que la urea en la disminución de la turbidez. Con concentraciones arriba de 2.0 M es casi instantánea la desaparición de turbidez, este mismo efecto fue observado pero con 4.0 y 5.0 M de urea. Con urea 0.5 y 1.0 M no se afecta la turbidez de la muestra, lo mismo sucede al exponer la muestra a 0.5 M de GuHCl. En otra comparación, el efecto con 1.0 M de GuHCl es similar al obtenido con 2.0 M de urea. Siguiendo el tamaño de las partículas por DLS, se observó un efecto muy diferente entre la urea y el GuHCl (Figura 49).

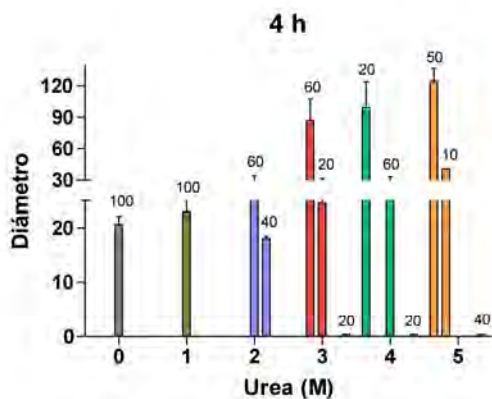
### a1) Urea (VLPs agregadas)



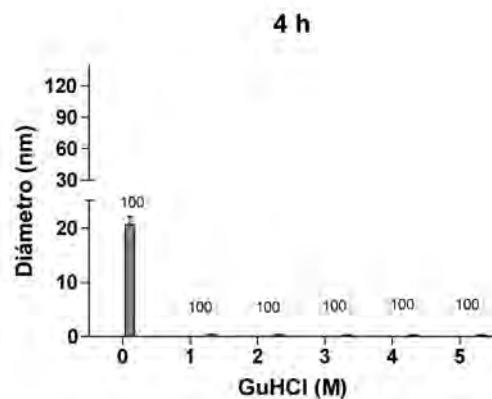
### b1) GuHCl (VLPs agregadas)



### a2) Urea (VLPs solubles)



### b2) GuHCl (VLPs solubles)



**Figura 49.** Efecto de la urea y GuHCl en el desensamble de las VLPs obtenidas por diálisis en amortiguador PBS. Tamaño de especies obtenidas después de exponer a las partículas a diferentes concentraciones de a) Urea y b) GuHCl. a1 y b1) VLPs agregadas (muestra sin microfiltrar, diálisis directa); a2 y b2) VLPs solubles (muestras microfiltradas con 0.22  $\mu\text{m}$ ). Los números arriba de las barras corresponden al porcentaje de cada una de las especies presentes en cada una de las muestras.

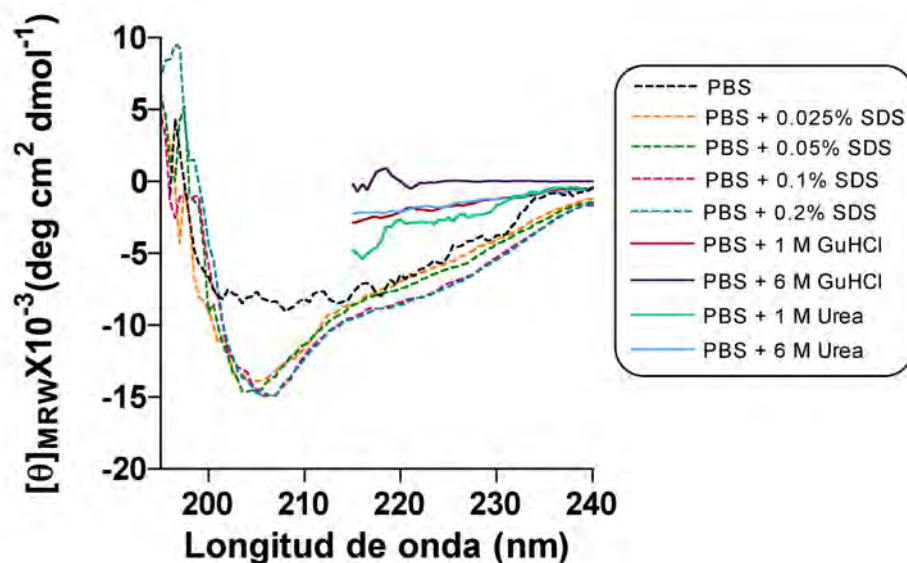




Se observó que de 1.0 a 3.0 M de urea, el tamaño de las partículas permaneció constante (20 nm) durante los primeros 15 min de exposición, mientras que solo un 30% de las partículas mantuvo su tamaño con 1.0 M de GuHCl durante este tiempo. La disociación de las partículas se da a concentraciones menores de ambos agentes caotrópicos al incrementar el tiempo de exposición a 4 h (Figura 49). Al incrementar la concentración de urea se pierde la turbidez de la muestra, pero por DLS se observó un incremento en el tamaño de las partículas, posiblemente se da un desplegamiento parcial de la proteína que posteriormente tiende a la formación de agregados (esto fue independiente del tiempo de exposición). Con GuHCl, el efecto fue diferente, a partir de los 15 min y con una concentración mayor a 1.0 M se reduce el tamaño de las partículas a una especie de 0.3 nm de diámetro, sugiriendo la disociación de las partículas y la desnaturalización de las proteínas (Figura 49b).

Al hacer análisis por CD se pudo confirmar que el GuHCl desestabiliza completamente la estructura secundaria de la proteína, mientras que el efecto de la urea es menor (Figura 50). Se observó el mismo espectro de dicroísmo con 1.0 M de GuHCl que con 6.0 M de urea. Mientras que con 1.0 M de urea todavía se mantiene algo de la estructura. Comparando el efecto de estos agentes caotrópicos con el del SDS se puede observar que este detergente no afecta de manera significativa la estructura de la proteína, sólo provoca ligeros cambios que ya han sido explicados anteriormente. La interacción de los tensoactivos con las proteínas debe ser completamente diferente a la de los desnaturalizantes químicos. La alta afinidad del SDS por las proteínas hace suponer que se encuentran involucrados diferentes mecanismos durante la desnaturalización de proteínas, si se compara con la ligera interacción de los desnaturalizantes químicos. El punto final del proceso de desnaturalización también es muy diferente, el comportamiento es mucho más complejo para el SDS, ya que existen diferentes formas en las que se puede unir a las proteínas y las concentraciones necesarias para desestabilizar la estructura de las proteínas se encuentra en el orden mM. Los desnaturalizantes químicos generalmente llevan a una pérdida total de la estructura de las proteínas, y para esto se requieren concentraciones molares; mientras que el estado desnaturalizado provocado por el SDS promueve la formación de  $\alpha$ -

hélices y es altamente dinámico. Las VLPs presentaron una menor estabilidad a la urea y al GuHCl, que al SDS ya que sólo fueron estables a concentraciones menores a 2.0 M de urea y 1.0 M de GuHCl. En estos agentes caotrópicos las partículas se disocian y también se puede desestabilizar completamente la estructura de la proteína VP2.



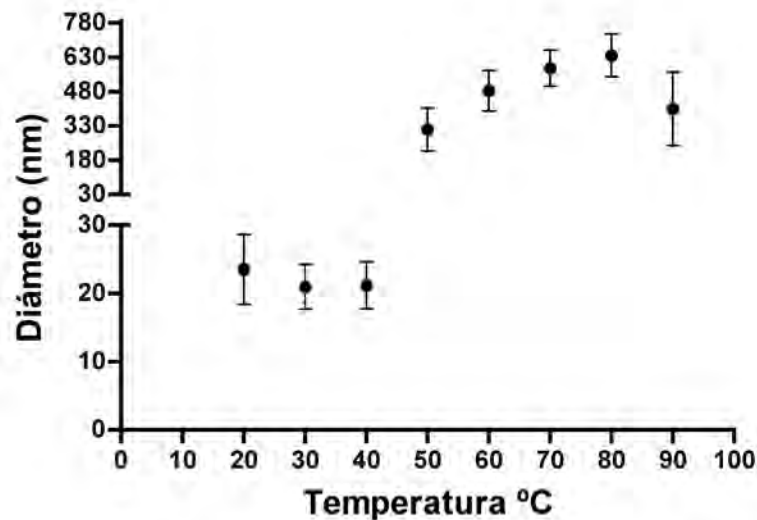
**Figura 50.** Comparación del efecto del SDS, urea y GuHCl en la estructura secundaria de las VLPs ensambladas en amortiguador PBS. Los espectros que corresponden a las muestras de GuHCl y urea no se pudieron obtener completos debido a un incremento en el voltaje del equipo y al ruido que se provoca en los espectros a longitudes de onda menores de 215 nm.

#### 6.3.4. Efecto de la temperatura en la estabilidad de las partículas.

Para una futura aplicación de estas partículas en el campo médico es necesario conocer su estabilidad a la temperatura, principalmente saber que tan estables son en condiciones fisiológicas. Se realizaron varios análisis, primero se utilizó la dispersión dinámica de luz para medir los cambios en el diámetro efectivo de las partículas en función de un incremento de la temperatura. Se analizaron las partículas solubles que

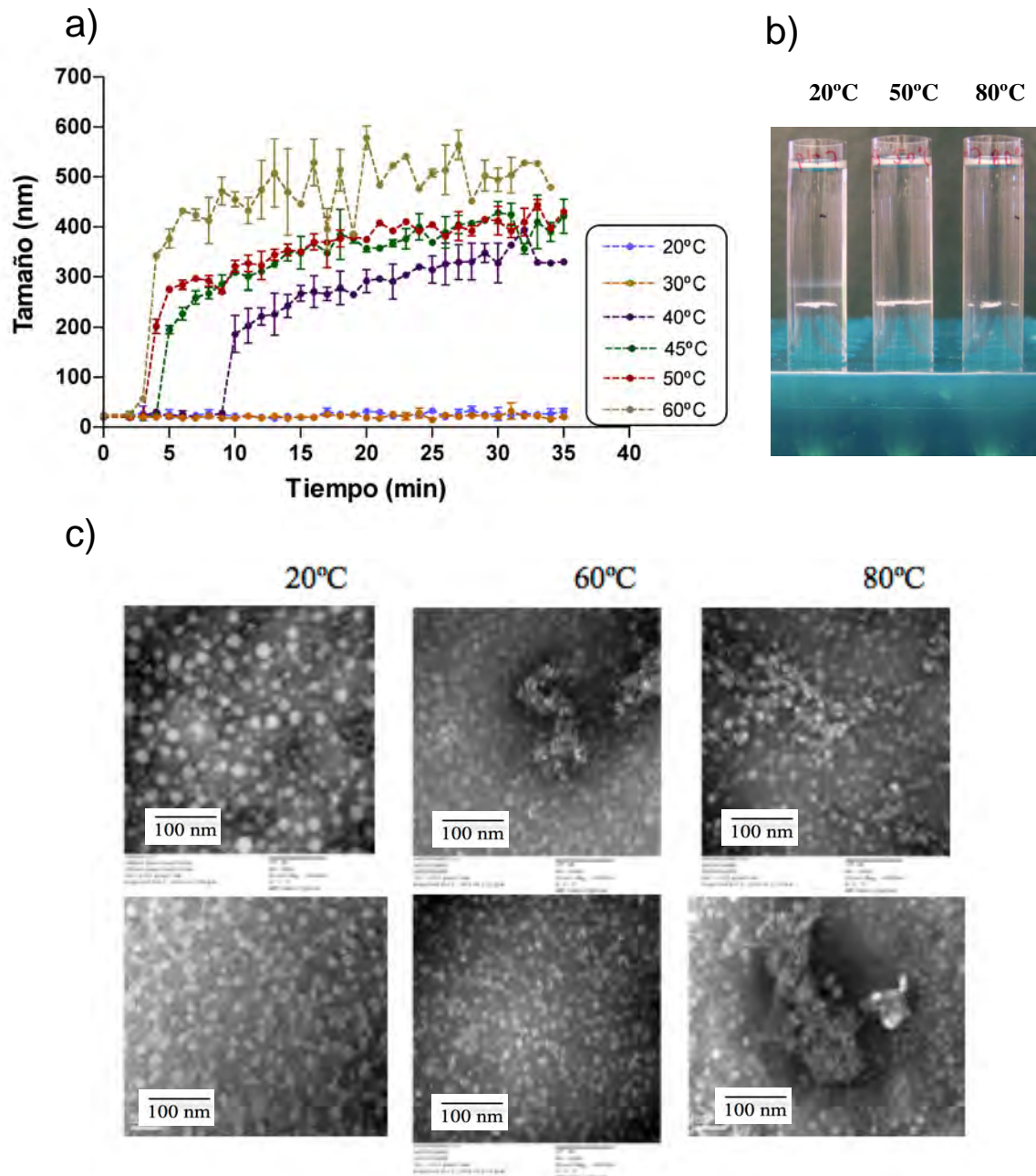
---

se recuperan después de microfiltrar (0.22  $\mu\text{m}$ ) las muestras dializadas en PBS a 4°C (Figura 51). El diámetro de las partículas se mantuvo entre 20-25 nm de diámetro hasta los 40°C. A partir de los 50°C se observó un incremento, de entre 10 y 30 veces en el tamaño de las partículas, lo que indica la formación de agregados.



**Figura 51.** Efecto de la temperatura en las VLPs ensambladas en amortiguador PBS. a) Tamaños obtenidos después de exponer a las VLPs a una rampa de temperatura de 20 a 90°C (con un incremento de 10°C cada 8 min).


Con el fin de estudiar mas a detalle el cambio en el diámetro de las partículas, se complementaron los resultados anteriores realizando cinéticas, en el dispersor de luz, en función de la temperatura. Algunas muestras también fueron analizadas por TEM y por gradientes de CsCl (Figura 52).



**Figura 53.** Efecto de la temperatura en las VLPs ensambladas en amortiguador PBS. a) Cinéticas en función de la temperatura, b) Gradientes de CsCl para las muestras expuestas a 20, 50 y 80°C durante 30 min, c) Micrografías de las partículas expuestas a 20, 60 y 80°C durante 30 min.

Se observó un incremento en el tamaño de las partículas a temperaturas mayores de 40°C, indicando su agregación. A los 40°C la agregación comenzó a partir de los 9 min,

---



mientras que a los 60°C se dio en tan solo 3 min. El tamaño de los agregados fue mayor entre mas alta es la temperatura a la que fueron expuestas las partículas, esto sugiere una desestabilización mas drástica de su estructura debido seguramente a la desnaturalización de las proteínas. Mediante TEM y gradientes de CsCl se observó que las partículas son completamente estables a 20°C y que una buena proporción mantiene su densidad y estructura al ser incubadas a 80°C por 30 min, esto demuestra que las partículas presentan una alta termoestabilidad (Figura 53). Hasta ahora no se ha reportado el efecto de la temperatura en el desensamble y estabilidad de las cápsides del PB19, sólo se conoce que su infectividad se puede perder por incubación a 60°C durante 12 min (Mani *et al.*, 2007; Ros *et al.*, 2006), sin embargo esto no puede estar completamente relacionado con la ruptura de las cápsides. La alta estabilidad que observamos para las VLPs del PB19 también se ha observado para otras cápsides vacías de la familia Parvoviridae, por ejemplo las VLPs del MVM se disocian a temperaturas cercanas a los 80°C en presencia de amortiguadores fisiológicos (Carreira *et al.*, 2004).

#### **6.4. Efecto de la arginina durante el ensamble y estabilidad de las VLPs.**

##### **6.4.1. Efecto de la arginina y pH durante el ensamble.**

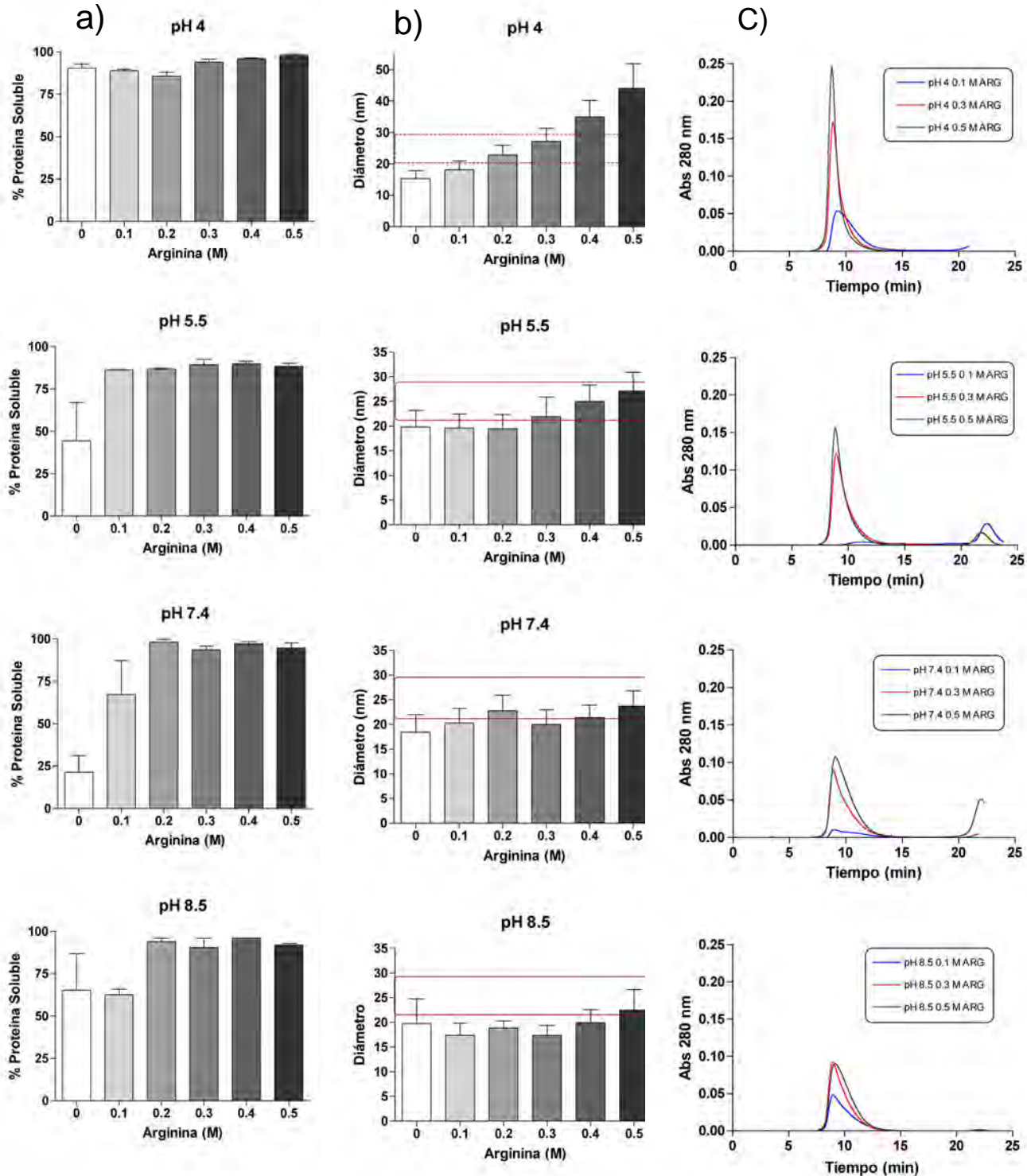
En algunos estudios se ha demostrado que la arginina puede facilitar el replegamiento de diversas proteínas recombinantes que se obtienen en forma de cuerpos de inclusión. Se ha encontrado que pueden utilizarse concentraciones entre 0.1 a 1.0 M cuando el replegamiento es inducido por diálisis o dilución (Tsumoto *et al.*, 2004). También ha sido reportado que la arginina a altas concentraciones (0.5 a 2.0 M) ayuda a la extracción de proteínas bien plegadas y activas que pudieran estar en los cuerpos de inclusión que se obtienen después de la lisis de células de *E. coli*. Hasta ahora no se conoce bien el mecanismo de acción de la arginina, pero se ha sugerido que todos estos efectos pueden estar relacionados con una supresión de la agregación de las proteínas y que principalmente pudiera deberse a la interacción entre el grupo guanidinio de la arginina y los triptófanos de las proteínas (Tsumoto *et al.*, 2004).



Como se observó anteriormente, durante el ensamble de las VLPs la proteína tiende a precipitar y sólo se logra recuperar alrededor de un 30% de partículas solubles, cuando se hace el ensamble en amortiguador PBS. Para evitar la agregación de las partículas, se decidió estudiar el efecto de diversas concentraciones de arginina (0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 M) y de diversas condiciones de pH (pH 4.0, 5.5, 8.5) durante el ensamble de las VLPs. Se determinó el porcentaje de proteína soluble para cada condición de diálisis y también se realizaron análisis por dispersión dinámica de luz y cromatografía de exclusión molecular (Figura 54). Al recuperar un alto porcentaje de proteína soluble se pudieron hacer análisis mediante cromatografía de exclusión molecular y en todos los casos se obtuvo un solo pico que corresponde al volumen de elución de la columna y que indica la presencia de partículas con un tamaño mayor a 600 kDa, esto de acuerdo a la calibración y al intervalo de exclusión de la columna (Figura 54c). El pico se hace mas angosto conforme se incrementa la concentración de arginina y este efecto fue mas notorio a pH 4.0 que es donde se observaron partículas con el doble de diámetro que el que se espera para las VLPs.

Se encontró que en casi todas las condiciones estudiadas la proteína permanece soluble después de la diálisis, sólo a concentraciones por debajo de 0.1 M de arginina y a valores de pH mayores a 4.0 un cierto porcentaje de la proteína se agrega (Figura 54a). Por ejemplo en PBS (pH 7.4), la proteína soluble se aumentó de un 60% a alrededor de un 95% al incrementar la concentración de arginina de 0.1 a 0.2 M. Mediante DLS se observó que en pH 5.5 y 8.5, conforme se aumenta la concentración de arginina se tiene un ligero aumento en el tamaño de las partículas (Figura 54b). En pH 5.5 y a concentraciones entre 0 y 0.3 M de arginina el tamaño de las partículas estuvo por debajo de los 20 nm, mientras que con 0.4 y 0.5 M de arginina el tamaño de las partículas aumentó a 25 y 28 nm, respectivamente. En pH 8.5 con una concentración de 0.5 M de arginina se observó un tamaño por arriba de los 20 nm. En PBS (pH 7.4) el tamaño de las partículas ensambladas fue más homogéneo y estuvo alrededor de los 20 nm, también al incrementar la concentración a 0.5 M de arginina el tamaño aumento ligeramente a 23 nm. El efecto mas drástico de la arginina se presentó en pH 4.0, ya que el tamaño de las partículas se duplicó al aumentar la concentración a 0.5 M, ya que la partículas presentaron un diámetro de 40 nm.



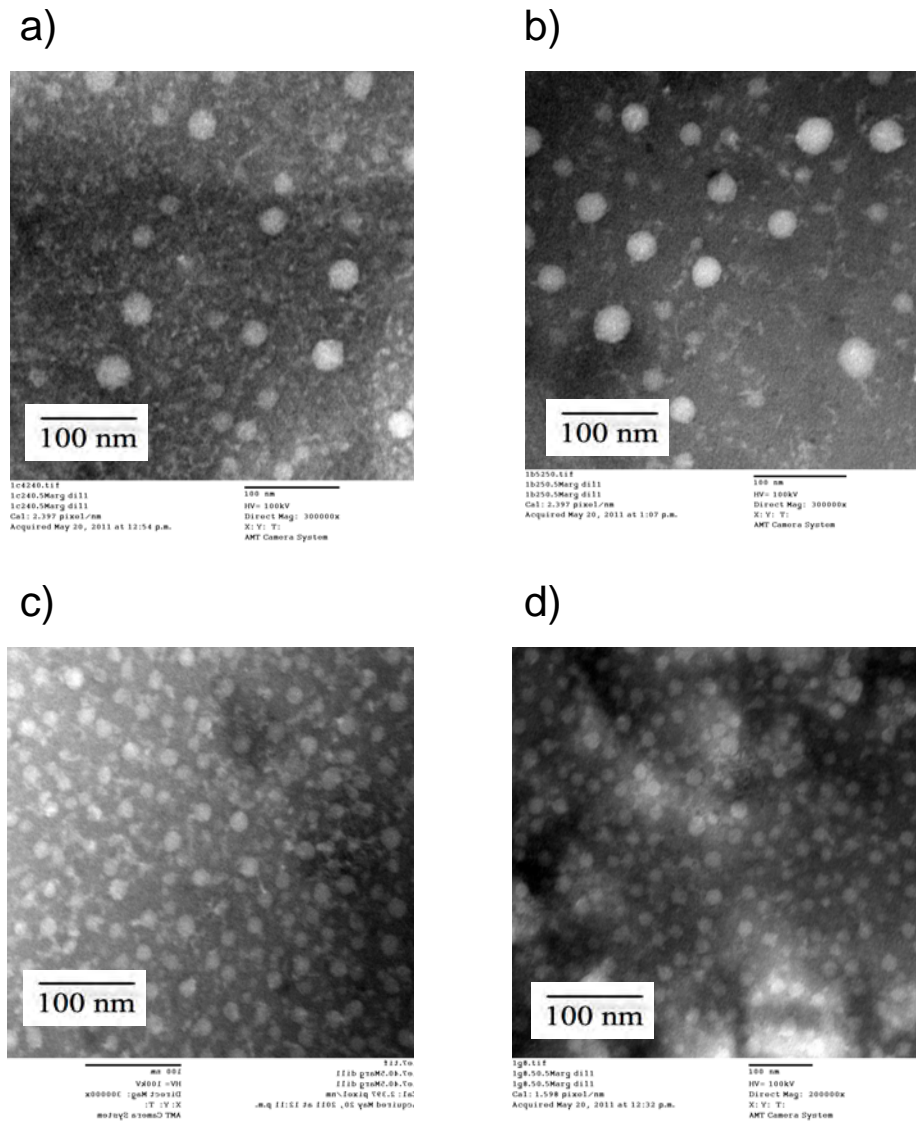


**Figura 54.** Efecto de la arginina en el ensamble de las VLPs a diferentes pHs. a) % Porcentaje de proteína soluble, b) Diámetro de las partículas, análisis por DLS, c) Análisis por cromatografía de exclusión molecular, se utilizó una columna Superdex-200 (intervalo de exclusión entre 10 y 600 kDa).





Las muestras dializadas con 0.5 M de arginina, en los diversos pHs, fueron analizadas por TEM para poder confirmar la presencia de las VLPs (Figura 55). Se observó que el tamaño y homogeneidad de las partículas estuvo en función del pH.



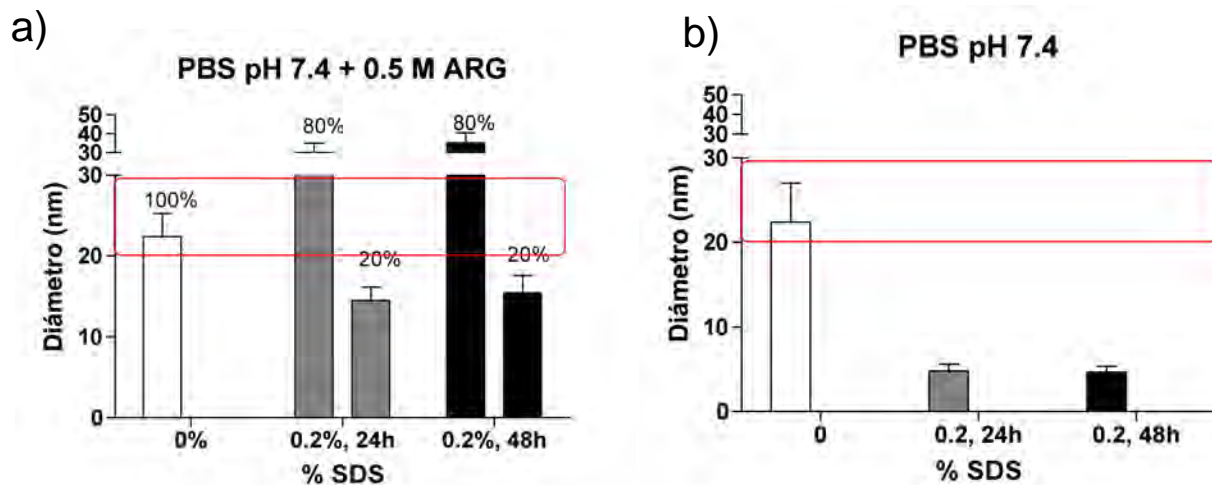
**Figura 55.** Efecto de la arginina en el ensamble de las VLPs a diferentes pHs. Micrografías obtenidas al dializar con 0.5 M de arginina en los diferentes pHs, a) Amortiguador de acetatos 20 mM pH 4, b) Amortiguador de acetatos 20 mM pH 5.5, c) Amortiguador PBS (pH 7.4), d) Amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 8.5.



En pH 4.0 y 5.5 con 0.5 M de arginina, se observaron partículas con un tamaño entre 35 y 50 nm, el cual es mayor al esperado para las VLPs del B19 (20-28 nm). Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos por dispersión dinámica de luz, ya que se identificaron partículas con un tamaño entre 30 y 50 nm (Figura 54b). En pH 7.0 y 8.5 se observaron partículas más homogéneas y con un tamaño alrededor de 20 nm que es más parecido al esperado para las VLPs. Después de diversos intentos para obtener VLPs homogéneas y solubles, se encontró que se puede lograr mediante la adición de arginina durante la diálisis. Estos últimos resultados sugieren que las mejores condiciones para llevar a cabo el ensamble de las VLPs es mediante diálisis en amortiguador PBS o Tris-HCl 20 mM pH 8.5, ambos con 0.5 M de arginina.

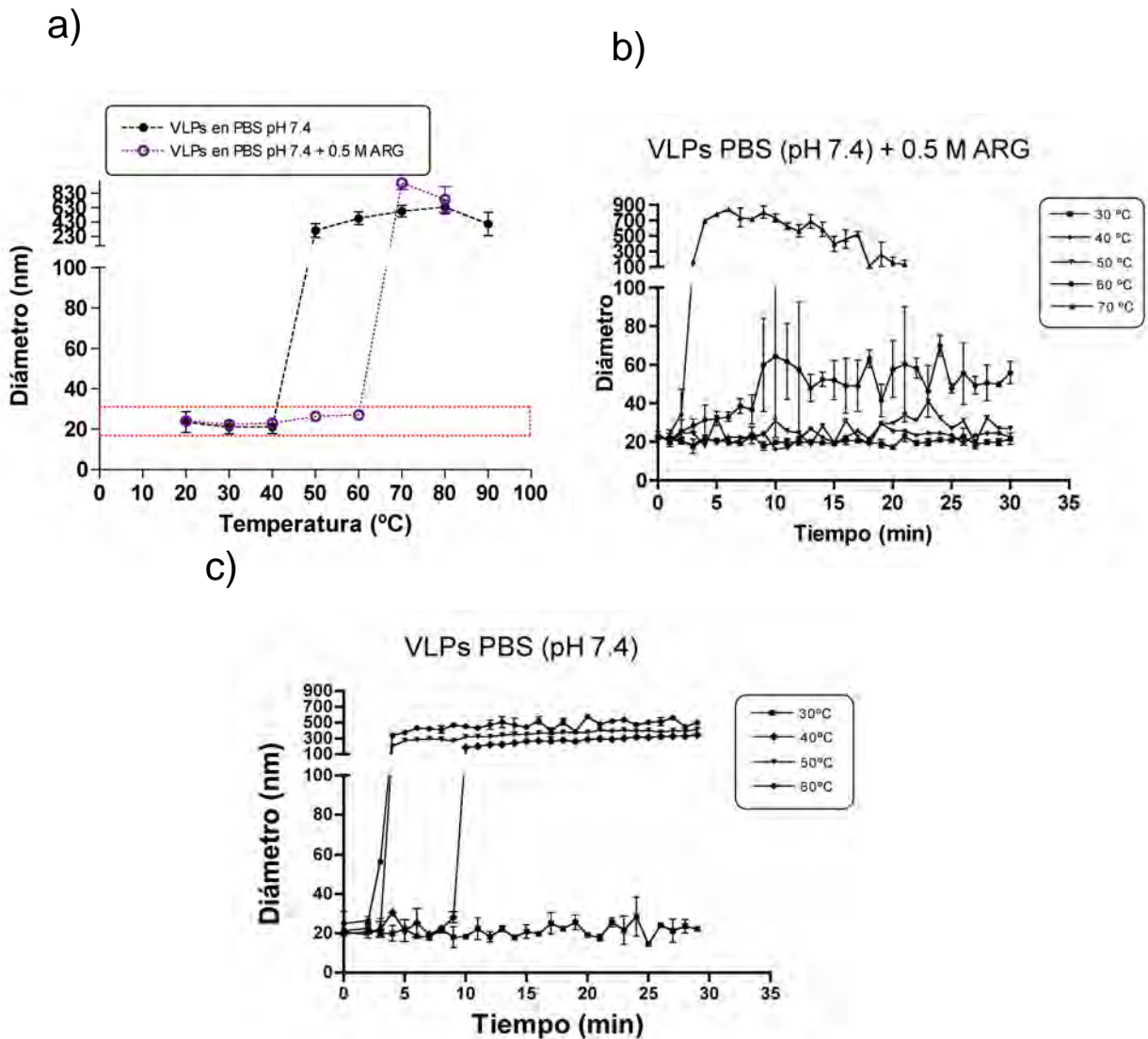
#### **6.6.2. Comparación del efecto del SDS y temperatura en las VLPs ensambladas en ausencia y presencia de 0.5 M de arginina.**

Las condiciones del solvente controlan varias propiedades de las proteínas en soluciones acuosas, incluyendo su solubilidad, estabilidad, desnaturalización e interacciones con otras moléculas y estructuras. En varios estudios se ha demostrado que la arginina puede evitar la agregación de las proteínas y que puede mejorar su estabilidad a la temperatura (Tsumoto et al., 2004). Por lo que se decidió estudiar si las partículas se vuelven más estables al SDS en presencia de arginina. Las partículas ensambladas en PBS con 0.5 M de arginina fueron expuestas a 0.2% de SDS durante 24 y 48 h, y se les determinó el tamaño por DLS (Figura 56a). Se observó que sólo un 20% de las partículas se disocia a partículas alrededor de 15 nm y un 80% presentó un tamaño ligeramente mayor del que presentaban las VLPs antes de exponerlas al detergente, el tamaño se incrementó de 22 nm a alrededor de 32 nm. No se tiene una idea clara a qué se deba esto, pero es posible que sea un efecto protector de la arginina, es posible que se una a las proteínas y evite que el SDS pueda interactuar con ellas. Como se puede observar en la figura 56 las partículas que no presentan arginina son mucho menos estables al SDS, ya que se provoca su disociación completa a una especie de 5 nm de diámetro, aparentemente las partículas se vuelven mas estables frente al detergente por efecto de la arginina (Figura 56b).



**Figura 56.** Efecto del SDS en las VLPs ensambladas en presencia de arginina, análisis por dispersión dinámica de luz. a) VLPs ensambladas en amortiguador PBS con 0.5 M de arginina, b) VLPs ensambladas en amortiguador PBS sin arginina.

En algunos estudios se ha demostrado que la arginina puede ayudar a estabilizar proteínas durante su almacenamiento y exposición a altas temperaturas, impidiendo su agregación. El factor neurotrófico ciliar (CNTF), es una proteína altamente inestable, se agrega rápidamente cuando es almacenada a 37°C. Se ha visto que la arginina es efectiva en reducir su agregación durante su incubación a 37°C (Arakawa *et al.*, 2003). En otro estudio se analizaron diversos compuestos que permitieran estabilizar las VLPs del virus de la influenza H1N1, se encontró que la arginina no tenía un efecto considerable, pero que la trehalosa, el sorbitol y la glicina si ayudaban a inhibir la agregación de las partículas al ser expuestas a temperatura (Kissmann *et al.*, 2010). Por lo que también se decidió investigar si las partículas se vuelven más estables a la temperatura en presencia de arginina. Como se puede observar en la figura 57, las partículas fueron mas estables cuando hay 0.5 M de arginina, ya que comienzan a agregarse hasta los 60°C, mientras que cuando no se tiene la presencia de arginina las partículas comienzan a agregarse desde los 40°C.



**Figura 57.** Efecto de la temperatura en las VLPs ensambladas en presencia de arginina, análisis por DLS. a) Tamaños obtenidos después de exponer a las VLPs a una rampa de temperatura de 20 a 90°C. Cinéticas en función de la temperatura para b) Las VLPs ensambladas en presencia de arginina y c) VLPs ensambladas en ausencia de arginina.



---

## 7. CONCLUSIONES GENERALES

- La proteína VP2-His forma cuerpos de inclusión cuando es expresada en *E. coli*. Mediante cromatografía de afinidad en condiciones desnaturalizantes, fue posible obtener altos rendimientos de proteína (50-70 mg/L de medio de cultivo), con una pureza alrededor del 95%.
- Es posible llevar a cabo el ensamble de las VLPs completamente *in vitro* a partir de la proteína VP2-His desnaturalizada en GuHCl 5.0 M. El ensamble depende de las condiciones de pH y de fuerza iónica que se utilicen durante la diálisis. A valores de pH ácidos y baja fuerza iónica, el rendimiento de ensamble es bajo, ya que sólo se obtienen intermediarios de ensamble. En pH 8.5 sólo se recupera un 50% de proteína soluble, que también corresponde a intermediarios de ensamble. En pH 7.0 y PBS (pH 7.4) se obtienen VLPs homogéneas, pero un 70% de las partículas es insoluble.
- Se puede favorecer el ensamble de las VLPs, partiendo de los intermediarios que se obtienen en pH 4.0, mediante un cambio a pH 7.0. Esto puede tener relevancia tecnológica para el encapsulamiento de moléculas de interés biomédico.
- Las VLPs pueden disociarse por exposición a bajas concentraciones de SDS y éste sólo provoca ligeros cambios en la estructura secundaria de la proteína VP2-His, sugiriendo un incremento en el contenido de hélices  $\alpha$ .
- El re-ensamble de las VLPs por remoción de SDS lleva a la formación de partículas heterogéneas y también a rendimientos de ensamble bajos ya que se tiene la formación de agregados amorfos de diversos tamaños.



- ① Las VLPs presentaron una menor estabilidad a la urea y al GuHCl, que al SDS ya que en este caso las partículas se disocian y también se pierde la estructura secundaria de las proteínas. Las VLPs sólo fueron estables a concentraciones menores a 2.0 M de urea y 1.0 M de GuHCl.
  
- ① Las VLPs ensambladas en PBS, presentaron buena estabilidad a la temperatura. Las partículas comienzan a agregarse a partir de los 40°C, pero una buena proporción mantiene su estructura al ser expuestas a 80°C durante 30 min.
  
- ① La arginina permite incrementar el rendimiento de VLPs solubles. Las mejores condiciones de ensamble fueron al utilizar amortiguador PBS (pH 7.4) y amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 8.5, ambos con 0.5 M de arginina, ya que se obtiene mas de un 95% de partículas solubles, con un tamaño y morfología homogénea.
  
- ① La arginina permite estabilizar a las VLPs cuando son expuestas a temperatura y a SDS. Las partículas ensambladas en PBS con 0.5 M de arginina comienzan a agregarse hasta los 60°C, por lo que fueron 20°C mas estables que cuando no se tiene la presencia de arginina.



---

## 8. CONCLUSIONES PARCIALES

- ⦿ Los cuerpos de inclusión obtenidos durante la expresión de la proteína en *E. coli* fueron mejor solubilizados con GuHCl 6 M que con urea 8 M. Al parecer la urea provoca la formación de oligómeros, posiblemente de proteína parcialmente desplegada.
- ⦿ Se logró simplificar la purificación de la proteína VP2 al incluir una etiqueta de histidinas en la región C-terminal.
- ⦿ La adición de diversos compuestos durante la diálisis (CaCl<sub>2</sub>, DTT, citratos, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Tween-20, glicerol), no mejoró el rendimiento de VLPs solubles.
- ⦿ La concentración inicial de GuHCl no afectó el ensamble de las VLPs. Se puede llevar a cabo el ensamble por efecto de dilución, al disminuir la concentración de GuHCl de 5.0 a 0.5 M, aunque las VLPs presentaron una mayor agregación.
- ⦿ Al incrementar la temperatura de ensamble de 4 a 37°C, se tiene una mayor agregación de las VLPs. El porcentaje de partículas completamente solubles disminuye de 30 a un 3%.
- ⦿ La precipitación de las partículas fue independiente de la concentración de proteína. A concentraciones entre 0.1 y 0.5 mg/mL se obtiene entre un 30 y 35% de proteína soluble, y a concentraciones mayores solo se recupera un 20%, indicando que la proteína tiende a agregarse más.
- ⦿ El tamaño de las VLPs depende del pH y concentración de arginina que se utilice durante la diálisis. En pH neutro y básico se obtienen partículas homogéneas con un tamaño entre 18 y 22 nm, mientras que a valores de pH ácidos, las partículas incrementan su diámetro a 30 y 40 nm. Estas partículas representan un polimorfismo interesante desde la perspectiva de la ciencia de proteínas, sin embargo también es interesante desde la perspectiva tecnológica.





---

## 9. PERSPECTIVAS

- ① Con el objetivo de intentar recuperar partículas solubles, se propone utilizar como sistema de expresión a *Pichia pastoris*, ya se obtuvo la clonación del gen vp2-His en el plásmido pPic 3.5 (9 kb), pero hasta ahora no se han logrado transformar células de *E.coli* DH5 $\alpha$  con la ligación obtenida. Es importante lograr recuperar partículas solubles ensambladas *in vivo* para poder comparar con nuestro sistema *in vitro*.
- ① Es importante demostrar el encapsulamiento de diversas moléculas como plásmidos, proteínas o nanopartículas magnéticas y de oro. El Parvovirus B19 presenta buenas ventajas para su aplicación en liberación específica. Por ejemplo se ha demostrado que puede reconocer células cancerosas (Hep G2) (Gilbert *et al.*, 2005). Además al encapsular alguna molécula modelo, se podría demostrar el ensamble de las partículas y así tener una mejor estimación de los rendimientos de ensamble.
- ① Una limitación de las partículas para su uso en el encapsulamiento de diversas moléculas es el espacio interior disponible, por lo que sería interesante estudiar más a detalle y estandarizar las condiciones en las que se demostró la presencia de partículas con un mayor tamaño (pHs bajos y presencia de arginina).
- ① Se podría ampliar la aplicación de estas VLPs al demostrar que es posible una modificación química de la superficie, ya sea con moléculas fluorescentes o con el desarrollo de quimeras, por ejemplo que adquieran las propiedades antigénicas de otros virus para el desarrollo de nuevas vacunas.
- ① Es muy importante demostrar el reconocimiento de estas partículas por diferentes líneas celulares permisivas en especial por líneas celulares cancerosas.



## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Alonso L.G., García-Alai M.M., Smal C., Centeno J.M., Iacono R., Castaño E., Gualfetti P., de Prat-Gay G. (2004). The HPV16 E7 viral oncoprotein self-assembles into defined spherical oligomers. *Biochemistry*, **43**:3310-3317.
2. Alexandrova R., Shikova E. (1999). Parvovirus B19. *Exp. Pathol. Parasitol.*, **3**: 38-44.
3. Amexis G., Ypung N.S.(2006). Parvovirus B19 empty capsids as antigen carriers for presentation of antigenic determinants of dengue 2 virus. *J. Infect. Dis.*, **194(6)**:790-794.
4. Aniagyei S. E., FuFort C., Kao C.C., Dragnea B. (2008). Self-assembly approaches to nanomaterial encapsulation in viral proteina cages. *J. Mater. Chem.*, **18**: 3763-3774.
5. Aniagyei S.E., Kennedy C.J., Stein B., Willits D.A., Douglas T., Young M.J., De M., Rotello V.M., Srisathiyarayanan D., Kao C.C., Dragnea B. (2009). Synergistic effects of mutations and nanoparticle templating in self-assembly of cowpea chlorotic mottle virus capsids. *Nano Lett.*, **9(1)**: 393-398.
6. Arakawa, T. Tsumoto K. (2003). The effects of arginine on refolding of aggregated proteins: not facilitate refolding, but suppress aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**: 148-152.
1. Arakawa T., Dix D. B. Chang, B. S. (2003). The effects of protein stabilizers on aggregation induced by multiple-stresses. *Yakugaku Zasshi*, **123**: 95-961.
2. Aristi U.G. 2002. Parvovirus B19. *Rev. Med. Hosp. Gen. Mex.*, **65(1)**:30-35.
3. Baker T.S., Olson N.H., Fuller S.D. (1999). Adding the third dimension to virus life cycles: Three-dimensional reconstruction of icosahedral viruses from cryo-electron micrographs. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63(4)**:862-922.
4. Bansal G.P., Hatfield J.A., Dunn F.E., Kramer A.A., Brady F., Riggin C.H., Collett M.S., Yoshimoto K., Kajigaya S., Young N.S. 1993. Candidate recombinant vaccine for human B19 parvovirus. *J Infect Dis.*, **167(5)**: 1034–1044.
5. Bertelotti-Ciarlet A., Ciarlet M., Crawford S.E., Conner M.E., Estes M.K. (2003). Immunogenicity and protective efficacy of rotavirus 2/6 virus-like particles produced by a dual baculovirus expression vector and administered intramuscularly, intranasally, or orally to mice. *Vaccine*, **21**: 3885-3900.
6. Bieniossek C., Richmond T.J., Berger I. (2008). MultiBac: multigene baculovirus-based eukaryotic protein complex production. *Curr. Protoc. Protein Sci.* NY: Wiley, 5.2.1-5.20.26.



7. Blum A.S., Soto C.M., Wilson C.D., et al., (2005). An engineered virus as a scaffold for three-dimensional self-assembly on the nanoscale. *Small*, **1**:702-706.
8. Brown K.E., Young N.S. (1997). Parvovirus B19 in Human Disease. *Annu. Rev. Med.* **48**:59-67.
9. Brown W.L., Mastico R.A., Wu M., Heal K.G., Adams C.J., Murray J.B., Simpson J.C., Lord J.M., Taylor-Robinson A.W., Stockley P.G. (2002). RNA Bacteriophage Capsid-Mediated Drug Delivery and Epitope Presentation. *Intervirology*, **45**: 371-80.
10. Brumfield S., Willits D., Tang L., Johnson J.E., Douglas T., Young M. (2004). Heterologous expresión of the modified coat protein of cowpea chlorotic mottle bromovirus results in the assembly of protein cages with altered architectures and function. *J. Gen. Virol.*, **85**:1049-1053.
11. Burger W. and Burge M.J. (2008). Digital Image Processing-An algorithmic Approach using Java. Springer-Verlag NY. ISBN 978-1-84628-379-6, www.imagingbok.com.
12. Cann A.J. (2007). Principles of molecular virology. 4<sup>a</sup> Edición, Elsevier Academic Press.
13. Cao P., Mei J.J., Diao Z.Y., Zhang S. (2005). Expresión, refolding and characterization of human soluble BAFF synthesized in *Escherichia coli*. *Prot. Expres. Purif.* **41**:199-206.
14. Carreira A., Menéndez M., Reguera J., Almendral J.M., Mateus M.G. (2004). In Vitro Disassembly of a Parvovirus Capsid and Effect on Capsid Stability of Heterologous Peptide Insertions in Surface Loops. *J. Biol. Chem.*, **279** (8):6517-6525.
15. Casal J.I. (1999). Use of parvovirus-like particles for vaccination and induction of multiple immune responses, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **29**:141–150.
16. Casal J.I (2001). Use of the baculovirus expression system for the generation of virus-like particles. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, **18**: 73–87.
17. Casini, G. L., Graham, D., Heine, D., Garcea, R. L., Wu, D. T. (2004). In vitro papillomavirus capsid assembly analyzed by light scattering. *Virology*, **325**: 320-327.
18. Chen X.S., Casini G., Harrison S.C. (2001). Papollomavirus Capsid Proteins Expresion in *Escherichia coli*: Purification and Assembly of HPV11 and HPV16 L1. *J. Mol. Biol.*, **307**: 173-182.
19. Chen C., Daniel M.C., Quinkert Z.T., De M., Stein B., Bowman V.D., Chipman P.R. Rotello V.M. Kao C.C., Dragnea B., (2006). Nanoparticle-Templated Assembly of Viral Protein Cages. *Nano Lett.*, **6**(4): 611-616.
20. Clark K.B., Lin S.C., Humphrey C., et al. (2009). Expression and characterization of human group C rotavirus virus-like particles in insecto cells. *Virology*, **387**: 267-272.
21. Colomar, M.C., Degoumois-Sahli, C., Beard P. (1993). Opening and refolding of simian virus 40 and in vitro packaging of foreign DNA. *J Virol.*, **67**:2779–2786.




22. Das D., Jacobs F., Feldmann H., Jones S.M., Suresh M.R. (2007). Differential expression of the Ebola virus GP<sub>1,2</sub> protein and its fragments in *E. coli*. *Protein Expr. Purif.*, **54(1)**: 117-125.
23. Dixit, S.K., Goicochea, N.L., Daniel, M.C., Murali, A., Bronstein, L., De, M., Stein, B., Rotello, V.M., Kao, C.C. and Dragnea, B. (2006). Quantum dot encapsulation in viral capsids. *Nano Lett.* **6**:1993–1999.
24. Dokland T. (1999). Scaffolding proteins and their role in viral assembly. *Cell.Mol. Life Sci.* **56**: 580-603.
25. Dominy B.N., Perl D., Schmid F.X., Brooks C.L. (2002). The effects of ionic strength on protein stability: the cold shock protein family. *J Mol Biol.* **319**: 541-554.
26. Douglas T., Young M. (1998). Host-guest encapsulation of materials by assembled virus protein cages. *Nature*, **39**: 152-155.
27. Enders M., Helbig S., Hunjet A., Pfister H., Reichhuber C., Motz M. (2007). Comparative evaluation of two commercial enzyme immunoassays for serodiagnosis of human parvovirus B19 infection. *J. Virol. Methods* **146**: 409–413.
28. Endres D., Zlotnick A. (2002). Model-Based Analysis of Assembly Kinetics for Virus Capsids or Other Spherical Polymers. *Biophys. J.* **83**: 1217-1230.
29. Endres D., Miyahara M., Moisant P. and Zlotnick A. (2005). A Reaction Landscape Identifies The Intermediates Critical for Self-assembly of Virus Capsids and other Polyhedral Structures. *Protein Sci.* **14**: 1518-1525.
30. Ernest H., Shetty R. (2005). Impact of Nanotechnology on Biomedical Sciences: Review of Current Concepts on Convergence of Nanotechnology with Biology. Online *J. of Nanotechnol.* <http://www.ee.udel.edu/~baloo/Nanoimpact.pdf> .
31. Eshagi M., Tan W.S., Chin W.K., Yusoff K. (2005). Purification of the extra-cellular domain of Nipah virus glycoprotein produced in *Escherichia coli* and possible application in diagnosis. *J. Biotechnol.*, **11**: 221-226.
32. Fischlechner M., Donath E. (2007). Viruses as building blocks for materials and devices. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**: 384-393.
33. Freivalds J., Rumnieks J., Ose V., Renhofa R., Kazaks A. (2008). High-level expresión and purification of bacteriophage GA virus-like particles from yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *Acta Universitatis Latviensis*, **745**: 75-85.
34. Grgacic E.V.L., Anderson D.A. Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods*, **40**: 60-65.
35. Gilbert, L., Toivola, J., White, D., Ihalainen, T., Smith W., Lindholm, L., Vuento, M., Oker-Blom, C. (2005). Molecular and structural characterization of fluorescent human parvovirus B19 virus-like particles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **331**: 527-535.



36. Gleiter S. Lilie H. (2001). Coupling of antibodies via proteína Z on modified polyoma virus-like particles. *Protein Sci.* **10**: 434-444.
37. Greco R., Michel M., Guetard D., et al. (2007). Production of recombinant HIV-1/HBV virus-like particles in *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* plants for a bivalente plan-based vaccine. *Vaccine*, **25**: 8228-8240.
38. Harvey A.H., Gallagher J.S., Levelt Sengers J.M.H. (1998). Revised Formulation for the Refractive Index of Water and Steam as a Function of Wavelength, Temperature and Density. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **27**: 761-774.
39. Heegaard E.D., Brown K.E. (2002). Human Parvovirus B19. *Clin. Microbiol. Rev.*, **15**: 485-505.
40. Inoue T., Kawano M., Takahashi R., et al., (2008). Engineering of SV40-based nano-capsules for delivery of heterologous proteins as fusions with the minor capsid proteins VP2/3. *J. Biotechnol.*, **134**: 181-192.
41. Jaeger J. (2005). Macromolecular Structure Determination by X-ray Cristallography. Encyclopedia of life science, Ltd. www.els.net.
42. Jain K.K. (2005). The Role of Nanobiotechnology in Drug Discovery. *Drug Discov. Today*, **10**: 1435-1442.
43. Johnston I.G., Louis A.A., Doye J.P.K. (2010). Modelling the self-assembly of virus capsids. *J. Phys.: Condens. Matter.*, **22**:104101. (<http://iopscience.iop.org/0953-8984/22/10/104101>).
44. Kajigaya S., Fuji H., Field A., Anderson S., Rosenfeld S., Anderson L.J., Shimada T., Young N.S. (1991). Self-assembled B19 Parvovirus Capsids, Produced in Baculovirus System, are Antigenically and Inmunogenically Similar to Native Virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 4646-4650.
45. Kaneshashi S., Ishizu K., Kawano M, et al. (2003). Simian virus 40 VP1 capsid protein forms polymorphic assemblies *in vitro*. *J. Gen Virol.*, **84**:1899-1905.
46. Kawana, K., Matsumoto K., Yoshikawa H., Taketani Y., Kawana T., Yoshiike K., Kanda T. (1998). A surface immunodeterminant of human papillomavirus type 16 minor capsid protein L2. *Virology* , **245**: 353-359.
47. Kauffman B., Simpson A.A., Rossman M.G. (2004). The Structure of Human Parvovirus B19. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**: 11628-11633.
48. Kawano M.A., Inoue T., Tsukamoto H., Takaya T., Enomoto T., Takahashi R.U., Yokoyama N., Yamamoto N., Nakanishi A., Imai T., Wada T., Kataoka K., Handa H. (2006). The VP2/VP3 minor capsid protein of simian virus 40 promotes the *in vitro* assembly of the major capsid protein VP1 into particles, *J. Biol. Chem.* **281**: 10164–10173.



49. Kawase M., Momoeda M., Young N.S., Kajigaya S. (1995). Modest Truncation of the Major Capsid Protein Abrogates B19 Parvovirus Capsid Formation. *J. Virol.* **69**: 5657-6571.
50. Kissmann J., Joshi S.B., Haynes J.R., Dokken L., Richardson C. (2010). H1N1 Influenza Virus-Like Particles: Physical Degradation Pathways and Identification of Stabilizers. *J. Pharm. Sci.* **100(2)**: 634-645.
51. Klikova M., Rhee S.S., Hunter E., Rum I. (1995). Efficient in vivo and in vitro assembly of retroviral capsids from gag precursor proteins expressed in bacteria. *J. Virol.*, **69(2)**: 1093-1098.
52. Kosukegawa, A., Arisaka, F., Takayama, M., Yajima, H., Kaidow, A. and Handa, H., (1996). Purification and characterization of virus-like particles and pentamers produced by the expression of SV40 capsid protein in insect cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1290**: 37–45.
53. Kuznetsov Y.G., Gurnon J.R., Van Etten J.L., McPherson A. (2005). Atomic force microscopy investigation of a chlorella virus, PBCV-1. *J. Struct. Biol.*, **149**: 256-263.
54. Kusnetsov Y.G., Zhang M., Menees T.M., McPherson A. (2005). Investigation by atomic force microscopy of the structure of Ty3 retrotransposon particles. *J. Virol.*, **79**:8032-8045.
55. Legendre D., Fastrez J. (2005). Production in *Saccharomyces cerevisiae* of MS2 virus-like particles packaging functional heterologous mRNAs. *J. Biotechnol.*, **117**:183-194.
56. Lewis J.D., Destito G., Zijlstra A., et al. (2006). Viral nanoparticles as Tools for intravital vascular Imaging. *Nat. Med.*, **12**: 354-360.
57. Lavelle L., Gingery M., Phillips M., Gelbart W.M. Knobler C.M. (2009). Phase Diagram of Self-assembled Viral Capsid Protein Polymorphs. *J. Phys. Chem. B.*, **113**: 3813-3819.
58. Lee N.Y., Kim E.C. (1999). Cloning and Recombinant Protein Expression of VP2 Gene of Human Parvovirus B19. *Korean J. Clin. Pathol.*, **19(2)**: 208-214.
59. Lee K.W., Tan W.S. (2008). Recombinant hepatitis B virus core particles: Association, dissociation and encapsidation of green fluorescent protein. *J. Virol. Methods*, **151**:172-180.
60. Li M., Beard P., Estes P.A., Lyon M.K., Garcea R.L. (1998). Intercapsomeric disulfide Bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *J. Virol.*, **72**: 2160-2167.
61. Li F., Zhang Z-P., Peng J., Cui Z-Q., Pang, D.W., Li K., Wei H-P., Zhou Y-F., Wen J-K., Zhang X-E. (2009). Imaging viral behavior in mammalian cells with self-assembled capsid-quantum-dot hybrid particles. *Small*, **5(6)**: 78-726.
62. Liljas L. (1999). Virus assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **9**:129-34.

- 
- 
63. Lowin T., Raab U., Schroeder J., Franssila R., Modrow S. (2005). Parvovirus B19 VP2-proteins produced in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison with VP2-particles produced by baculovirus-derived vectors. *J. Vet. Med. B*, **52**: 348–352.
64. Ludwig C., Wagner R. (2007). Virus-Like particles-universal molecular toolboxes. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**: 537-545.
65. Mach H., Volkin D.B., Troutman R.D., Wang B., Lou Z., Jansen K.U., Shi L. (2006). Disassembly and reassembly of yeast-derived recombinant human papillomavirus virus-like particles (HPV VLPs). *J. Pharm. Sci.*, **10**: 2195-2206.
66. Malboeuf C.M., Simon D.A.L., Lee Y.E., et al. (2007). Human papillomavirus like particles mediate functional delivery of plasmid DNA to antigen presenting cells in vivo. *Vaccine*, **25**: 3270-3276.
67. Manavalan P., Johnson W.C., Jr. (1987). Variable selection methods improves the prediction of proteína secondary structure from circular dichroism. *Anal. Biochem.* **167**:76-85.
68. Mani, B., Gerber M., Lieby P., Boschetti N., Kempf C., Ros C. (2007). Molecular mechanism underlying B19 virus inactivation and comparison to other parvoviruses. *Transfusion*, **47**: 1765-1774.
69. Maranga L., Rueda P., Antonis A.F.G., et al. (2002). Large scale production and Downstream processing of a recombianant porcine parvovirus vaccine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **59**: 45-50.
70. Michel P.O., Mäkela A.R., Korhonen E., Toivola J., Hedman L., Söderlund-Venermo M., Hedman K., Oker-Blom C. (2008). Purification and analysis of polyhistidine-tagged human parvovirus B19 VP1 y VP2 expressed in insect cells. *J. Virol. Methods*, **152**: 1-5.
71. Molinari P., Peralta A., Taboga O. (2007). Production of rotavirus-like particles in *Spodoptera frugiperda* larvae. *J. Virol. Methods*, **147**: 364-367.
72. Mortola E., Roy P. (2004). Efficient assembly and release of SARS coronavirus-like particles by a heterologous expresión system. *FEBS Lett.*, **576**: 174-178.
73. Natilla A., Nemchinov L.G. (2008). Improvement of PVX/CMV CP expresión tool for display of short foregn antigens. *Protein Expres. Purif.*, **59**: 117-121.
74. Newman M., Suk F.M., Cajimat M., Chua P.K. (2003). Stability and Morphology comparisons of Self-Assembled Virus-Like Particles from Wild-Type and Mutants Human Hepatitis B Virus Capsid Proteins. *J. of Virology*, **77(24)**: 12950-12960.
75. Noad, R., Roy P.(2003). Virus-like particles as immunogens. *Trends Microb.* **11**: 38–444.
76. Ochoa W.F., Chatterji A., Lin T., Johnson J.E. (2006). Generation and Strcutural Analysis of Reactive Empty Particles Derived From an Icosahedral Virus. *Chem. Biol.* **13**: 771-778.






77. Ogasawara Y., Amexis G., Yamaguchi H., Kajigaya S., Leppla S.H., Young N.S. (2006). Recombinant Viral-like Particles of Parvovirus B19 as Antigen Carriers of Anthrax Protective Antigen. *In vivo*, **20**: 319-324.
78. Otzen D. (2011). Protein-Surfactant interactions: A tale of many states. *Acta Biochim. Biophys.*, **1814**: 562-591.
79. Plummer E. M., Manchester M. (2010). Viral nanoparticles and virus-like particles: platforms for contemporary vaccine design. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, n/a. doi: 10.1002/wnan.119.
80. Pattenden L.K., Middelberg A.P.J., Niebert M., Lipin D.I. (2005). Towards the preparative large-scale precision manufacture of virus-like particles. *Trends in Biotechnol.*, **23(10)**: 523-529.
81. Peabody D.S. (2003). A viral platform for chemicals modification and multivalent display. *J. Nanobiotech.*, 1:5.
82. Peixoto C., Ferreira T.B., Carrondo M.J.T., Cruz P.E., Alves P.M. (2006). Purification of adenoviral vectors using expanded bed chromatography. *J. Virol. Methods*, **32**:121-126.
83. Phelps J.P., Dao P., Jin H., Rasochova L. (2007). Expression and self-assembly of cowpea mosaic chlorotic mottle virus-like particles in *Pseudomonas fluorescens*. *J. Biotechnol.*, **128**: 290-296.
84. Phelps J.P., Dang, N., Rasochova I. (2007). Inactivation and purification of cowpea mosaic virus-like particles displaying peptide antigens from *Bacillus anthracis*. *J. Virol. Methods*, **14**: 146-153.
85. Rodrigues T., Carvalho A., Carmo M., Carrondi M.J.T., Alves P.M., Cruz P.E. (2007). Scaleable purification process for gene therapy retroviral vectors. *J. Gene Med.* **9**: 233-243.
86. Ros, C., Baltzer C., Mani B., Kempf C. (2006). Parvovirus uncoating *in vitro* reveals a mechanism of DNA release without capsid disassembly and striking differences in encapsidated DNA stability. *Virology*, **345**: 137-147.
87. Sánchez-Rodríguez, S.P., Münch-Anguiano, L., Bustos-Jaimes, I. (2010). Advances in the development of virus-like particles as tools in medicine and nanoscience. *Curr. Chem. Biol.*, **4(3)**: 231-243.
88. Santi L., Huang Z, Mason H. V. (2006). Virus-like particles production in green plants. *Methods*, **40**: 66-76.
89. Schneemann A., Young M.J., 2003. Viral assembly using heterologous expresión systems and cell extracts. *Adv. Protein. Chem.*, **64**: 1-36.
90. Senger T., Schädlich L., Gissmann L., Müller M. (2009). Enhanced papillomavirus-like particles production in insect cells. *Virology*, **388**: 344-353.



91. Sharma R., Sharma C.L. (2007). Quadrivalent human papillomavirus recombinant vaccine: The first vaccine for cervical cancers. *J. Cancer Res Ther.*, **3(2)**: 92-95.
92. Sico, C., White S., Tsao E. and Varma, A. (2002). Enhanced kinetic extraction of parvovirus B19 structural proteins. *Biotechnol. Bioengin.*, **80**: 250–256.
93. Simpson A.A., Nandhagopal N., Van Etten J.L. Rossmann M.G. (2003). *Acta Cryst.*, **D59**:2053-2059.
94. Singh P., Destito G., Scheemann A., Manchester M. 2006. Canine parvovirus-like particles, a novel nanomaterial for tumor targeting. *J. Nanobiotech.*; 4:2.
95. Singh P., González M.J., Manchester M. (2006). Viruses and Their Uses in Nanotechnology. *Drug Develop. Res.*, **67**: 23-41.
96. Singh S., Zlotnick A. (2003). Observed Hysteresis of Virus Capsid Disassembly Is Implicit in Kinetic Models of Assembly. *J. Biol. Chem.* **278**: 18249-18255.
97. Steinmetz N.F., Lomonosoff G.P., Evans D.J. (2006). Cowpea mosaic virus for material fabrication: addressable carboxylate groups on a programmable nanoscaffold. *Langmuir*, **22**: 3488-3490.
98. Stubenrauch K, et al., (2000). Purification of a viral coat protein by an engineered polyionic sequence. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, **737**: 77-84.
99. Sun J., Dufort C., Daniel M-C. Murali A., Chen C., Gopinath K., Stein B., De M., Rotello V.M. Holzenburg A., Kao C.C. Dagnea B. (2007). Core-controlled polymorphism in virus like particles. *PNAS*, **104(4)**: 1354-1359.
100. Tang J., Lee K.K., Bothner B., Baker T.S. (2009). Dynamics and Stability in Maturation of a T=4 Virus. *J. Mol. Biol.* **392**: 803-812.
101. Tsumoto K., Umetsu M., Kumagai I., Ejima D., Philo J.S., Arakawa T. (2004). Role of Arginine in Protein Refolding, Solubilization, and Purification. *Biotechnol. Prog.*, **20**: 1301-1308.
102. Umetsu, M., Tsumoto K., Hara M., Ashish K., Goda S., Adschiri T., Kumagai I. (2003). How additives influence the refolding of immunoglobulin-folded proteins in a stepwise dialysis system. *J. Biol. Chem.* **278**: 8979-8987.
103. Wang Q., Kaltgrad E., Lin T., Johnson J.E., Finn M.G. (2002). Natural Supramolecular Building Blocks: Wild-Type Cowpea Mosaic Virus. *Chem. Biol.*, **9**: 805-811.
104. Wang Q., Lin T., Johnson J., Finn M. (2002). Natural supramolecular building blocks: cysteine-added mutants of cowpea mosaic virus. *Chem Biol.*, **9**: 813-819.
105. Wang L., Smith D. (2005). Capsid Structure and Dynamics of a Human Rhinovirus Probed by Hydrogen Exchange Mass Spectrometry. *Protein Sci.* **14**: 1661-1672.
106. Willits D., Zhao X., Olson N. et al. (2003). Effects of the cowpea chlorotic mottle bromovirus beta hexamer structure on virion assembly. *Virology*, **306**: 280-288.

- 
- 
107. Wingfield P.T., Stahl S.J., Kaufman J., Zlotnick A., Hyde C.C., Gronenborn A.M., Clore G.M. (2007). The extracellular domain of immunodeficiency virus gp41 protein: Expression in *Escherichia coli*, purification, and crystallization. *Protein Sci.* **6**: 1653-160.
108. Wong S., Momoeda M., Field A., Kajigaya S., Young N.S. (1994). Formation of Empty B19 Parvovirus Capsids by the Truncated Minor Capsid Protein. *J. Virol.* **68**: 4690-4694.
109. Wróbel B., Yosef Y., Oppenheim A.B., Oppenheim A. (2000). Production and purification of SV40 major capsid protein (VP1) in *Escherichia coli* strains deficient for the GroELs chaperone machine. *J. Biotechnol.*, **84**: 285-289.
110. Yamada T., Iwasaki Y., Tada H., Iwabuki H., Chuah M.K., VendenDriesche T., Fukuda H., Kondo A., Ueda M., Seno M., Tanizawa K., Kuroda S. (2003). Nanoparticles for the Delivery of Genes and Drugs to Human Hepatocytes. *Nat. Biotechnol.*, **21**: 885-890.
111. Yang Y.W., Teng C. (1998). Circular Dichroism and Fluorescence Studies of Polyomavirus Major Capsid Protein VP1. *J. of Protein Chemistry*, 17(1): 6-71.
112. Yang Y.W., Teng C.C. (1999). Conformational changes of polyomavirus major capsid protein VP1 in sodium dodecyl sulfate solution. *J. Peptide Res.*, **53**: 75-8.
113. Zhang Y., Song S., Liu C., Wang Y., Xian X., He Y., Wang J., Liu F., Sun S. (2007). Generation of chimeric HBc proteins with epitopes in *E. coli*: Formation of virus-like particles and a potent inducer of antigen-specific cytotoxic immune response and anti-tumor effect in vivo. *Cellular Immunology*, **247**: 18-27.
114. Zhao X., Fox J.M. Olson N.H., Baker T.S., Yuong M.J. (1995). In vitro assembly of cowpea chlorotic mottle virus from coat protein expressed in *Escherichia coli* and in vitro-transcribed viral cDNA. *Virology*, **207**: 486-494.
115. Zlotnick A. (1994). To Build a Virus Capsid: An equilibrium Model of the Self Assembly of Polyhedral Protein Complexes. *J. Mol. Biol.* **241**: 59-67.
116. Zlotnick A., Johnson J.M., Wingfield P.W., Stahl S.J., Endres D. (1999). A Theoretical Model Successfully Identifies Features of Hepatitis B Virus Assembly. *Biochemistry*, **38**: 14644-14652.
117. Zlotnick A., Aldrich R., Johnson J.M, Ceres P., Young M.J. (2000). Mechanism of capsid assembly for an icosahedral plant virus. *Virology*, **277**: 450-456.
118. Zlotnick A., Ceres P., Singh S. Johnson, J.M. (2002). A small molecule inhibits and misdirects assembly of hepatitis B virus capsids. *J. Virology*, **76(10)**: 4848-4854.

## 11. ANEXOS

### Anexo 1. Diversas condiciones utilizadas para la purificación de VLPs de diversos virus.

Virus	Sistema de Expresión	Purificación	Rendimientos	Bibliografía
CCMV (Cowpea chlorotic mottle virus)	<i>Pichia pastoris</i>	Gradientes de CsCl	0.05 a 0.5 mg/g de biomasa húmeda	Brumfield <i>et al.</i> , 2004
CCMV (Cowpea chlorotic mottle virus)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Precipitación con polietilenglicol (PEG) y gradientes de sacarosa	2.6 mg/mL	Phelps <i>et al.</i> , 2007
CCMV (Cowpea chlorotic mottle virus)	<i>Escherichia coli</i>	Solubilización de cuerpos de inclusión en urea 8 M, replegamiento y filtración en gel	10 mg/L de medio de cultivo, con 50-80% de pureza.	Willits <i>et al.</i> , 2003
CCMV Quimera con péptidos de <i>Bacillus anthracis</i>	Plantas de frijol (Cowpea <i>Vigna unguiculata</i> )	Centrifugación diferencial y cromatografía de intercambio aniónico	0.3 g/kg de tejido de planta	Phelps <i>et al.</i> , 2007
Bacteriófago GA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Pichia pastoris</i>	Filtración en gel CL4B	0.6 a 2 mg/g de células 3 mg/g de células	Freivalds <i>et al.</i> , 2008
Papilomavirus HPV57L1	Baculovirus Multi-Bac	Gradientes de sacarosa y CsCl	1.5 a 2.8 mg/10 <sup>6</sup> células.	Senger <i>et al.</i> , 2009
Papilomavirus HPV	Baculovirus	Gradientes de sacarosa y CsCl	-----	Malboeuf <i>et al.</i> , 2007
HPV11 y HPV16	<i>Escherichia coli</i>	Cromatografía de afinidad y filtración en gel	-----	Chen <i>et al.</i> , 2001
Parvovirus canino CPV	Baculovirus	Gradientes de sacarosa	0.5-2.5 mg/L de células infectadas	Singh <i>et al.</i> , 2006
Parvovirus B19 VP2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gradientes de sacarosa	0.4 mg/mL de células lisadas de levadura	Lowin <i>et al.</i> , 2005
Parvovirus B19 VP1 y VP2 (His)	Baculovirus	Cromatografía de afinidad	30-35 mg / 300 mL de medio de cultivo	Michel <i>et al.</i> , 2008
Parvovirus Porcino PPV	Baculovirus	Precipitación y diafiltración	----	Maranga <i>et al.</i> , 2002
Simian rotavirus VP2/VP6	Baculovirus	Gradientes de CsCl	0.4 µg/célula	Molinari <i>et al.</i> , 2007
Simian rotavirus VP2/VP6	Baculovirus	Gradientes de CsCl	2.49 mg/ 6x10 <sup>8</sup> células infectadas	Bertelotti-Ciarlet <i>et al.</i> , 2003
SV40 Virus del simio 40-VP1	Baculovirus	Gradientes de CsCl	-----	Kanesashi <i>et al.</i> , 2003
Bacteriófago MS2	<i>Escherichia coli</i>	Filtración en gel CL4B	-----	Peabody, 2003
Bacteriófago MS2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Precipitación con PEG y gradientes de CsCl	2x10 <sup>15</sup> partículas/L de medio de cultivo	Legendre <i>et al.</i> , 2005
SARS coronavirus Con S,E,M y N	Baculovirus	Gradientes de sacarosa	0.2 mg/ 10 <sup>9</sup> células	Mortola y Roy, 2004
HIV / HBV (Virus de la inmunodeficiencia humana/ virus de la hepatitis)	Plantas <i>Nicotiana tabacum</i> y <i>Arabidopsis thaliana</i>	-----	2-26 ng HBsAg/g de planta 3-15 ng HBsAg/g Arabidopsis	Greco <i>et al.</i> , 2007
SSV40-VP1	<i>Escherichia coli</i>	Cromatografía de afinidad	-----	Wróbel <i>et al.</i> , 2000



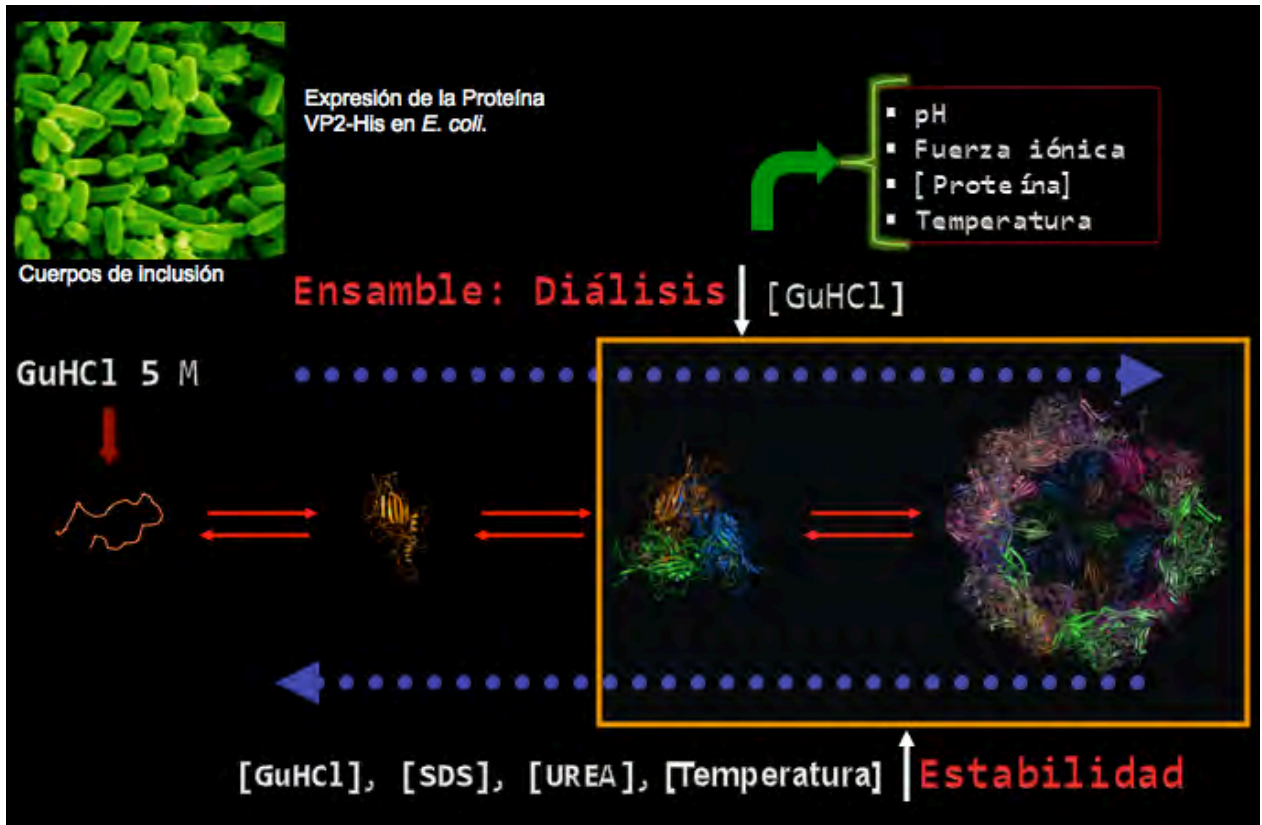
## Anexo 2. Ejemplos de VLPs producidas para estudios de reconocimiento.

VLPs	Molécula encapsulada o insertada en la superficie	Estrategia de encapsulamiento o de interacción	Líneas celulares para estudios de reconocimiento
Bacteriófago MS2	Encapsulamiento de Oligodeoxinucleótidos (ODNs) y decoración covalente con transferrina	Los ODNs fueron sintetizados como extensiones covalentes al loop TR del fago MS2	RAW264 (derivada de células de leucemia mielógena)
Papilomavirus humano HPV16 L1/L2	Carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster (CFDA-SE).	Las VLPs purificadas fueron marcadas superficialmente con CFDA-SE.	COS-7 (derivada de células de mono)
Papilomavirus humano HPV L1/L2	Encapsulamiento del plásmido pEGFP-N1	Encapsulamiento por asociación del plásmido con la región C-terminal de la proteína L2.	HEK 293T (derivada de células embrionarias de riñón)
Poliomavirus humano JC VP1	Encapsulamiento del plasmido pCMV-β-Gal	Disociación de las VLPs por remoción de Ca <sup>2+</sup> y reducción de puentes disulfuro. Adición del plásmido y reasociación de las VLPs por adición de Ca <sup>2+</sup> .	SGV (derivadas de astrocitos fetales humanos) B, T (derivadas de linfocitos) COS7 (derivadas de células de mono)
Parvovirus canino CPV-VP2	Marcaje con verde oregón succinimidil éster 488 (OG-488)	Las lisinas de la superficie de las VLPs fueron derivatizadas con OG-488	Diversas células cancerígenas HT-29, HeLa y MDA-MB231
Parvovirus porcino PPV-VP2-OVA	Marcaje con Alexa fluor 488 succinimidil éster (AF)	El gene VP2 fue fusionado al péptido (OVA <sub>257-264</sub> ) de la ovalbúmina de huevo de pollo. Las VLPs obtenidas fueron posteriormente marcadas con AF	Ratones C57BL/6
Virus de la hepatitis B (HBV) HBcAg	Encapsulamiento de proteína verde fluorescente (GFP)	Disociación de las VLPs HBcAg con 2.5 M de urea. Adición del plásmido y reasociación por remoción del agente desnaturizante por diálisis.	-----
Virus pneumotrópico murino (MPtV)	Marcaje de PTVs con Alexa fluor 488	Las VLPs purificadas fueron marcadas superficialmente con AF	Diversas líneas celulares B16, RMA, DC (ratón) HEF (humano) RCC (humano) SK-N-AS (humano) RD (humano) HeLa (humano) 293 (humano) COS-1, GMK (mono)
Virus de la leucemia Murina de Moloney (MoMLV)	Péptido HLA clase II/alérgeno	Las moléculas de HLA fueron organizadas como αβ-heterodímeros sobre la superficie de las PTVs	Jurkat T – TCR Artv 1 expresando el promotor IL2 para producción de luciferasa
Virus SV40 P1, VP2/3	Encapsulamiento de proteína verde fluorescente (EGFP) y citosina desaminasa de levadura (yCD)	Encapsulamiento de las proteínas por fusión con el extremo C-terminal	CV-1 (derivadas de fibroblastos)
Virus del mosaico del frijol CPMV	Marcaje de VLPs con Alexa Fluor 555, 488 y fluoresceína	Las VLPs purificadas fueron derivatizadas superficialmente con las 3 diferentes moléculas	Línea celular cancerosa HT-1080 Embriones de ratón fueron inyectados intravenosamente con CPMV-A555

Sánchez-Rodríguez et al., 2010.

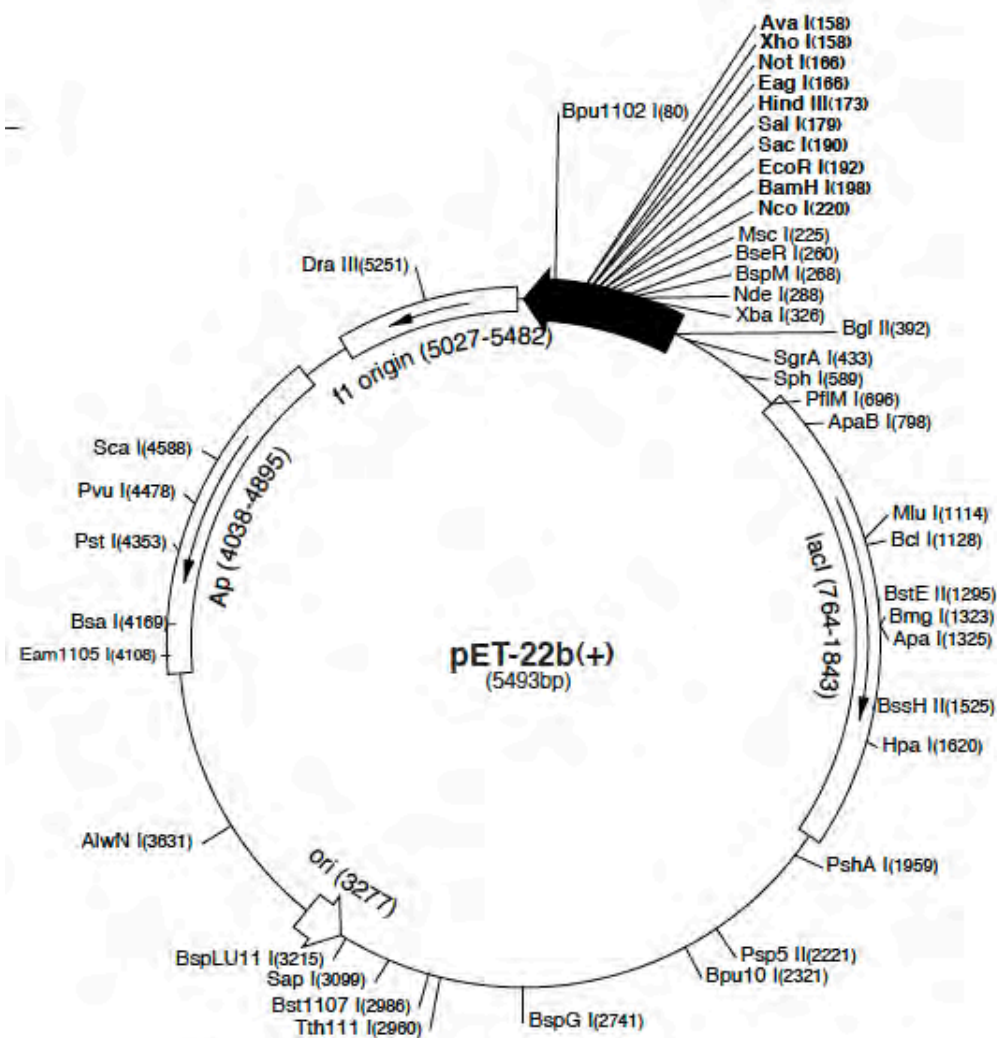


**Anexo 3.** El ensamble y la estabilidad de las VLPs dependerá de diversos factores como son, la fuerza iónica, el pH, la temperatura y la presencia de detergentes.



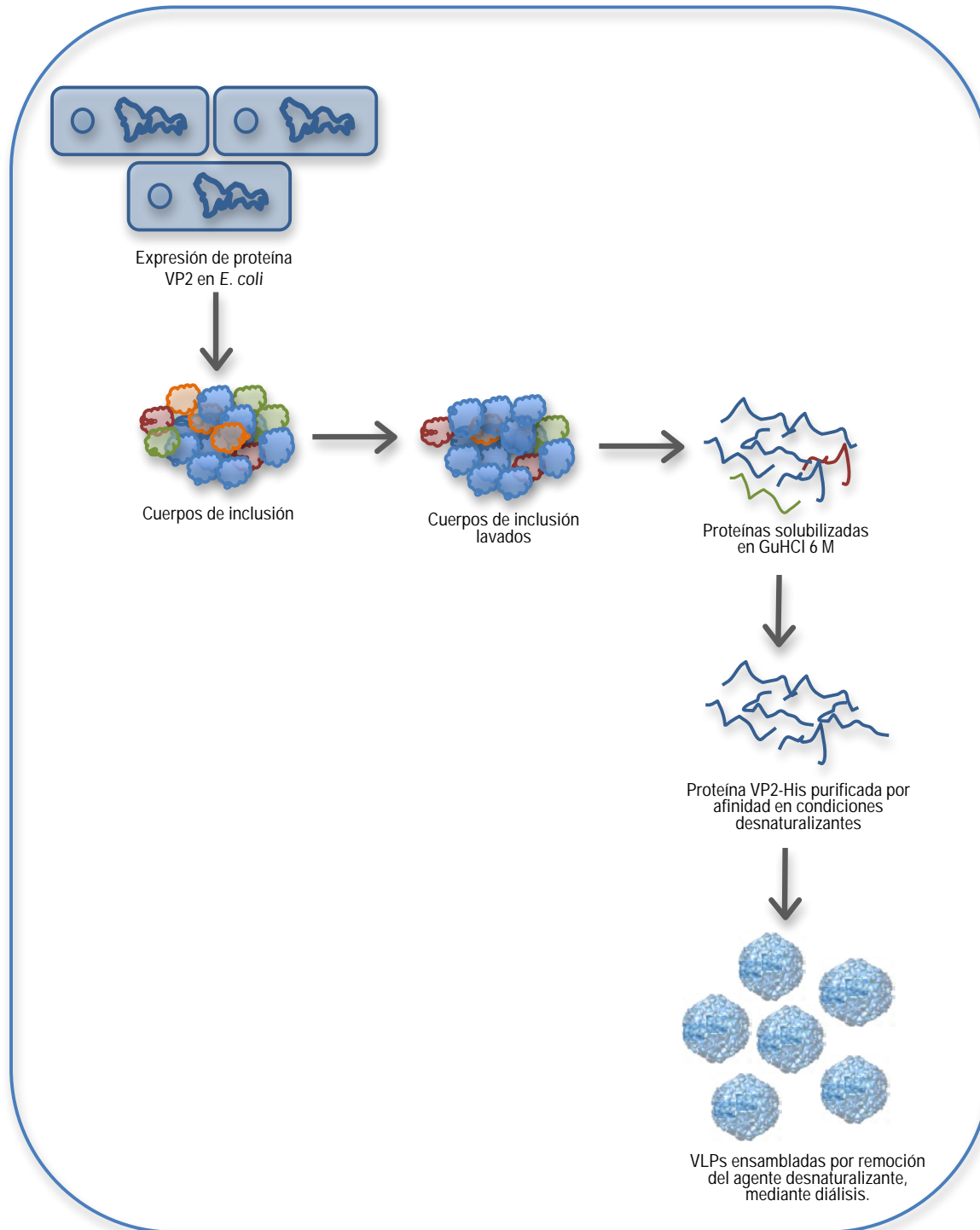


**Anexo 4.** El plásmido empleado para la transformación fue el pET-22b(+) (Novagen No. Cat. 69744-3) que contiene el gen que codifica para la  $\beta$ -lactamasa como marcador de transformación, y el gen *lacI* para mantener un control estricto sobre la expresión.

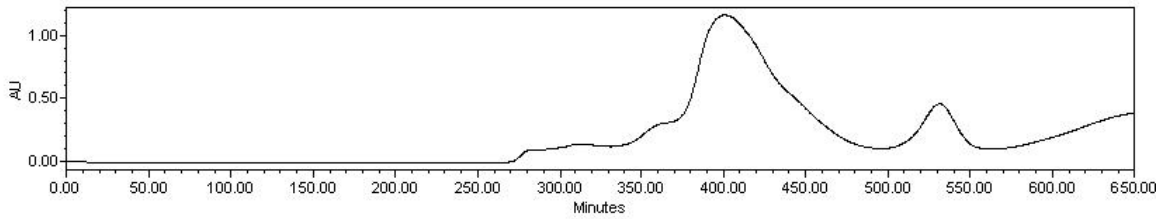




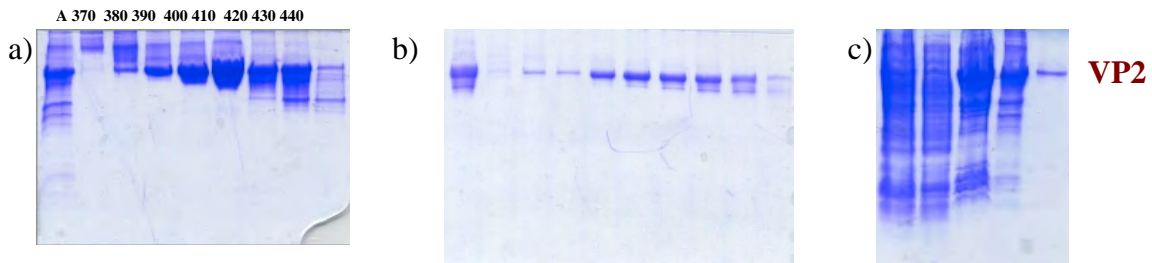
**Anexo 5.** Esquema general del procedimiento propuesto para la recuperación de las VLPs.



## Anexo 6

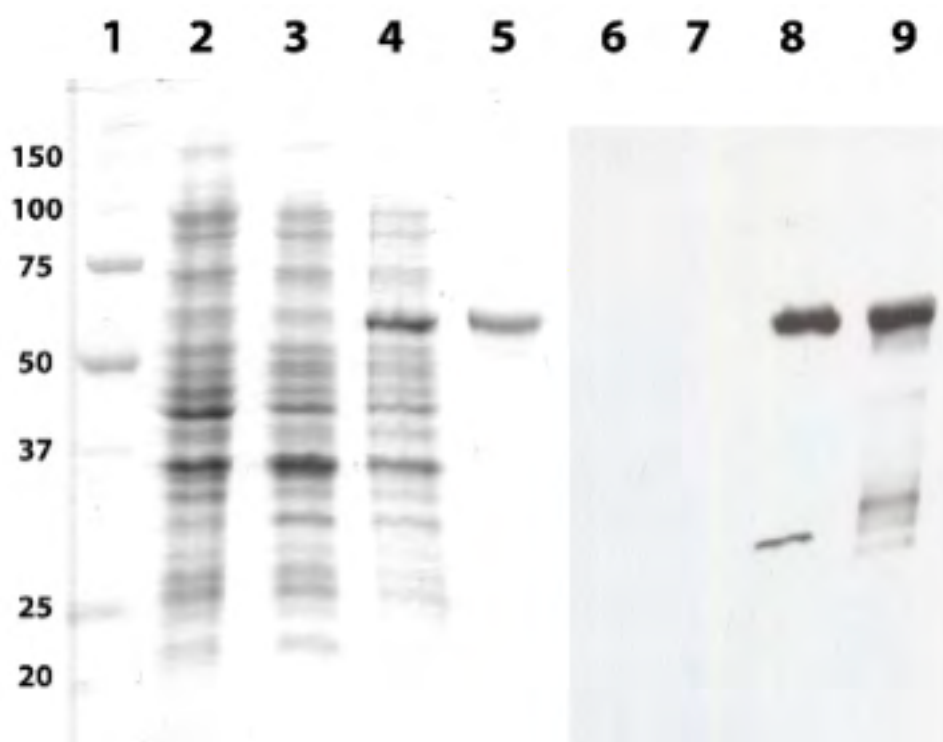


MUESTRAS	VOLUMEN (ml)	PROTEÍNA (mg/ml)	PROTEÍNA TOTAL (mg)
Células completas	100	8.17	817
Sobrenadante	95	4.89	464
Pellet	100	3.39	339
Pellet lavado y solubilizado	100	2.93	293
VP2 después de filtración en gel	3.5	5.2	18.2



Cromatografía de exclusión molecular en condiciones desnaturalizantes, utilizando dos columnas acopladas (Superdex 200 (1.6x80 cm) y Superosa 12 (1.6x40 cm)) pre-equilibradas con amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8, conteniendo 5 mM de DTT, 0.15 M de NaCl, 1 mM de EDTA y 6.0 M de GuHCl a un flujo de 0.25 mL/min. a) Fracciones colectadas en la primera cromatografía, b) Fracciones colectadas al volver a realizar cromatografía a la fracción 410 y c) Pureza después de todas las etapas de purificación.

## Anexo 7



Gel de electroforesis con las diferentes etapas de purificación de la proteína VP2-His (60 kDa); La línea 1 corresponde al marcador de peso molecular; la línea 2 a las células de *E. coli* BL21 (DE3) lisadas; la línea 3 a las células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pETVP2His y lisadas antes de inducir; la línea 4 a las células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plásmido pETVP2His, lisadas después de 4 h de inducción con IPTG; la línea 5 la proteína VP2-His pura. Las líneas 6 a la 9 corresponden al análisis por Western blot de las muestras correspondientes a las líneas 2 a 5. (Se observa una ligera degradación de la proteína durante el proceso de purificación, que podría deberse a la presencia de proteasas).

## Anexo 8

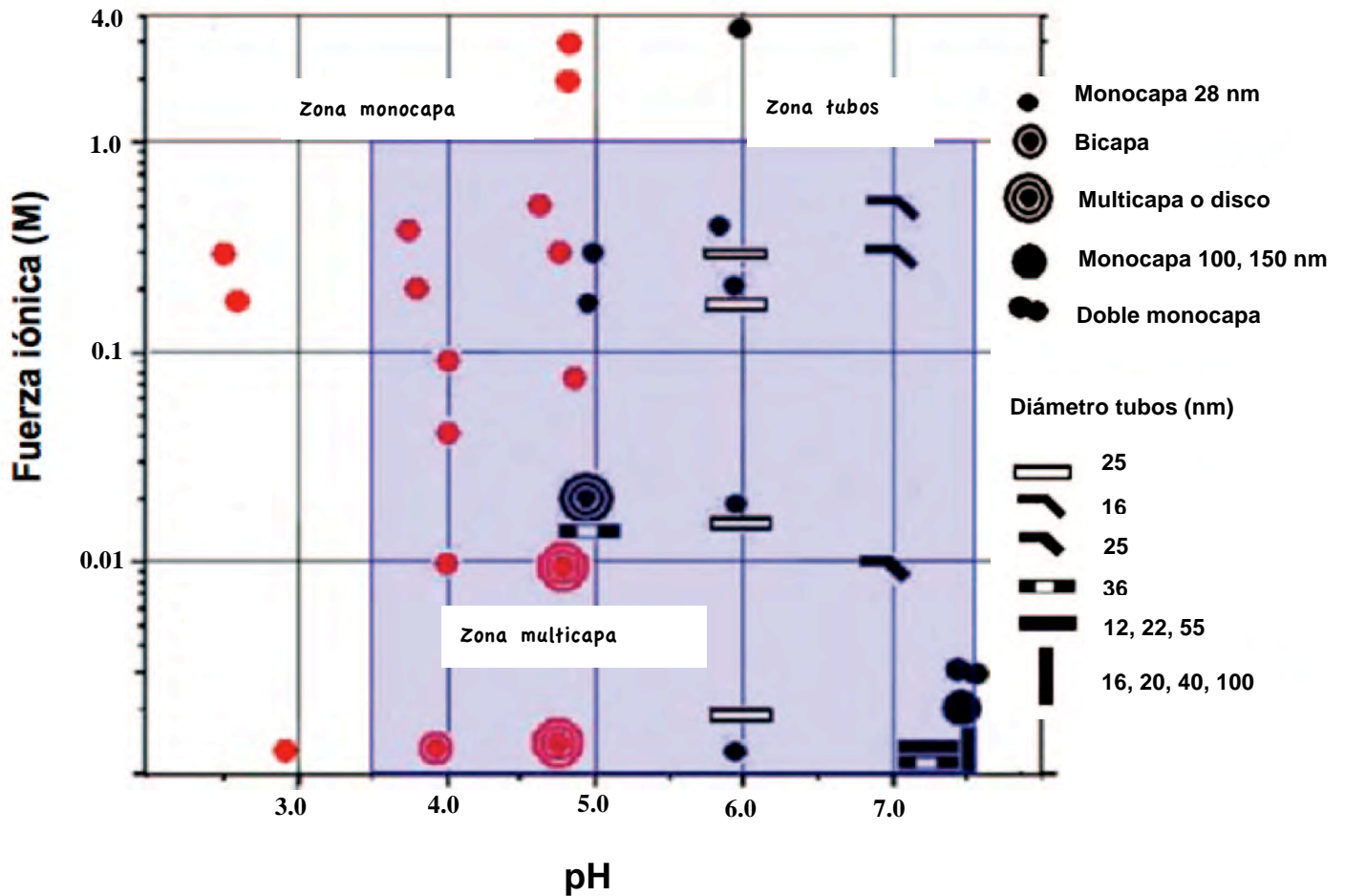


Diagrama de fase reportado para el ensamble de las VLPs del virus CCMV en función del pH y fuerza iónica. En este diagrama se hace una comparación de la morfología que presentan las VLPs bajo diferentes condiciones de diálisis. Los símbolos rojos corresponden al utilizar amortiguador de cacodilato de sodio y los símbolos negros al utilizar citrato de sodio. El rectángulo marcado en azul corresponde a las condiciones estudiadas por Bancroft y por Butler (Lavelle *et al.*, 2004).

---

---

## Anexo 9



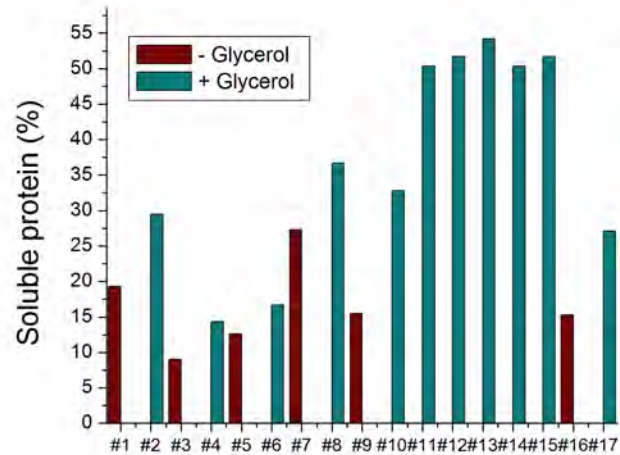
1	Diálisis en pH 4 con 0.25 M de NaCl y posteriormente diálisis en pH 7 con 0.5 M de NaCl
2	Diálisis pH 4, 0.25 M NaCl

Turbidez observada después de hacer un cambio de pH 4 a pH 7 mediante diálisis. La cual podría estar correlaciona con el ensamble de las VLPs a partir de los oligocapsómeros obtenidos en pH 4.

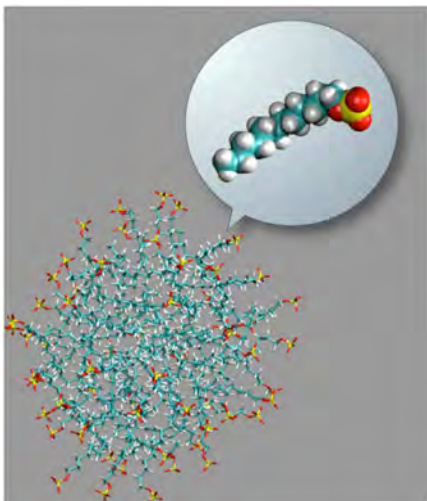


## Anexo 10

1	PBS pH 7.4
2	PBS pH 7.4 Glycerol 5%
3	pH 6.0 0.25 M NaCl
4	pH 6.0 0.25 NaCl, 1mM CaCl <sub>2</sub> , Glycerol 5%
5	pH 6.0 0.5 M NaCl
6	pH 6.0 0.5 NaCl, 1mM CaCl <sub>2</sub> , Glycerol 5%
7	pH 7.7 0.25 M NaCl
8	pH 7.7 0.25 NaCl, 1mM CaCl <sub>2</sub> , Glycerol 5%
9	pH 4 0.25 M NaCl to pH 4 0.5 M NaCl
10	pH 4 0.25 M NaCl to pH 4 0.5 M NaCl Glycerol 5%
11	pH 7.5 0.25 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 1mM CaCl <sub>2</sub> , Glycerol 5%
12	pH 7.5 0.25 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 1mM CaCl <sub>2</sub> , Glycerol 5%
13	pH 7.5 0.25 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 1mM CaCl <sub>2</sub> , Glycerol 5%
14	pH 7.7 0.5 NaCl, 1mM CaCl <sub>2</sub> , Glycerol 10%
15	pH 7.9 0.5 NaCl, 1mM CaCl <sub>2</sub> , Glycerol 10%
16	pH 4 0.25 M NaCl to pH 7 0.5 M NaCl
17	pH 4 0.25 M NaCl to pH 7 0.5 M NaCl Glycerol 5%

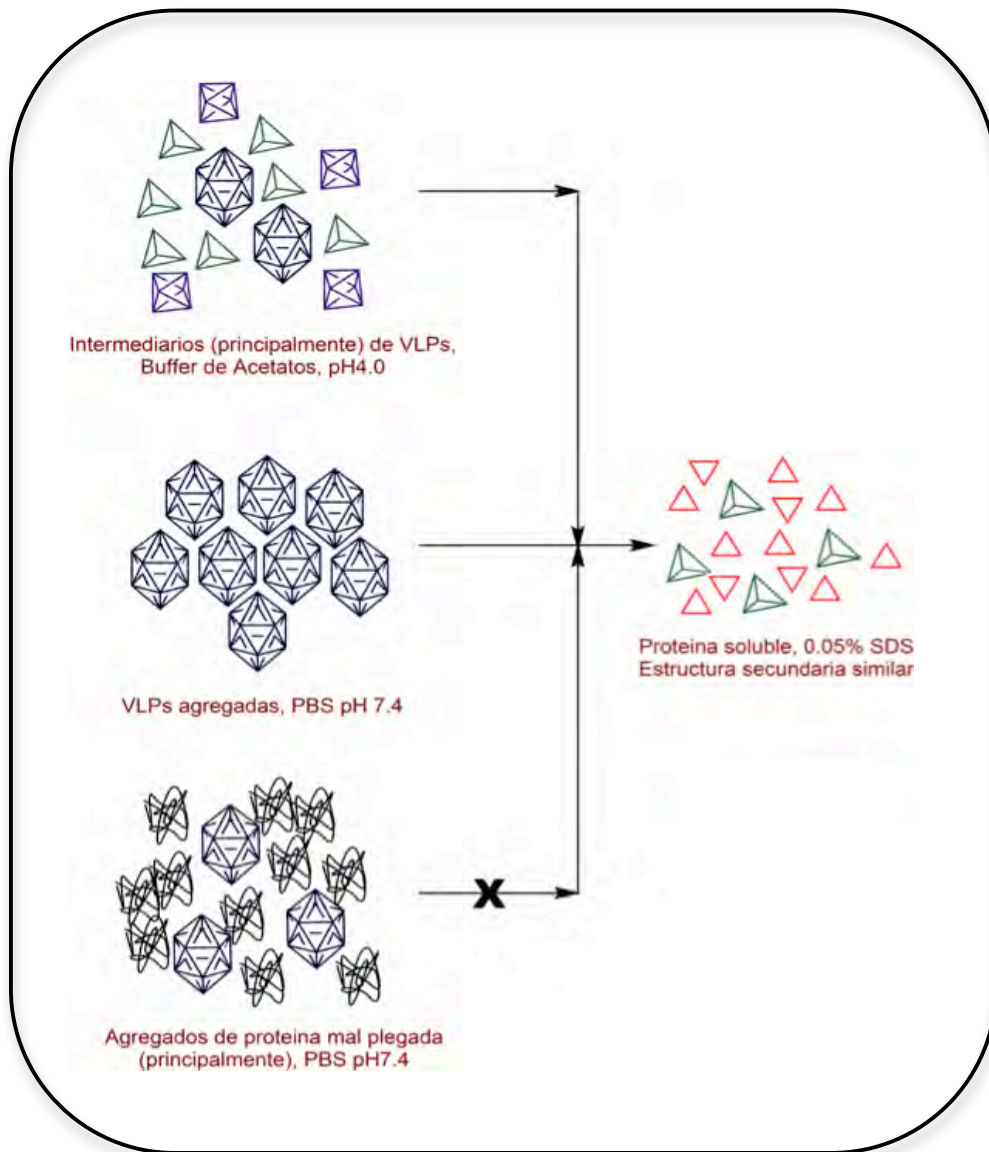


## Anexo 11



El SDS (dodecilsulfato sódico, C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S) es un tensoactivo aniónico que presenta una cola hidrofóbica de 12 átomos de carbono, adosada a una cabeza polar que presenta un grupo sulfato y que le da carga negativa

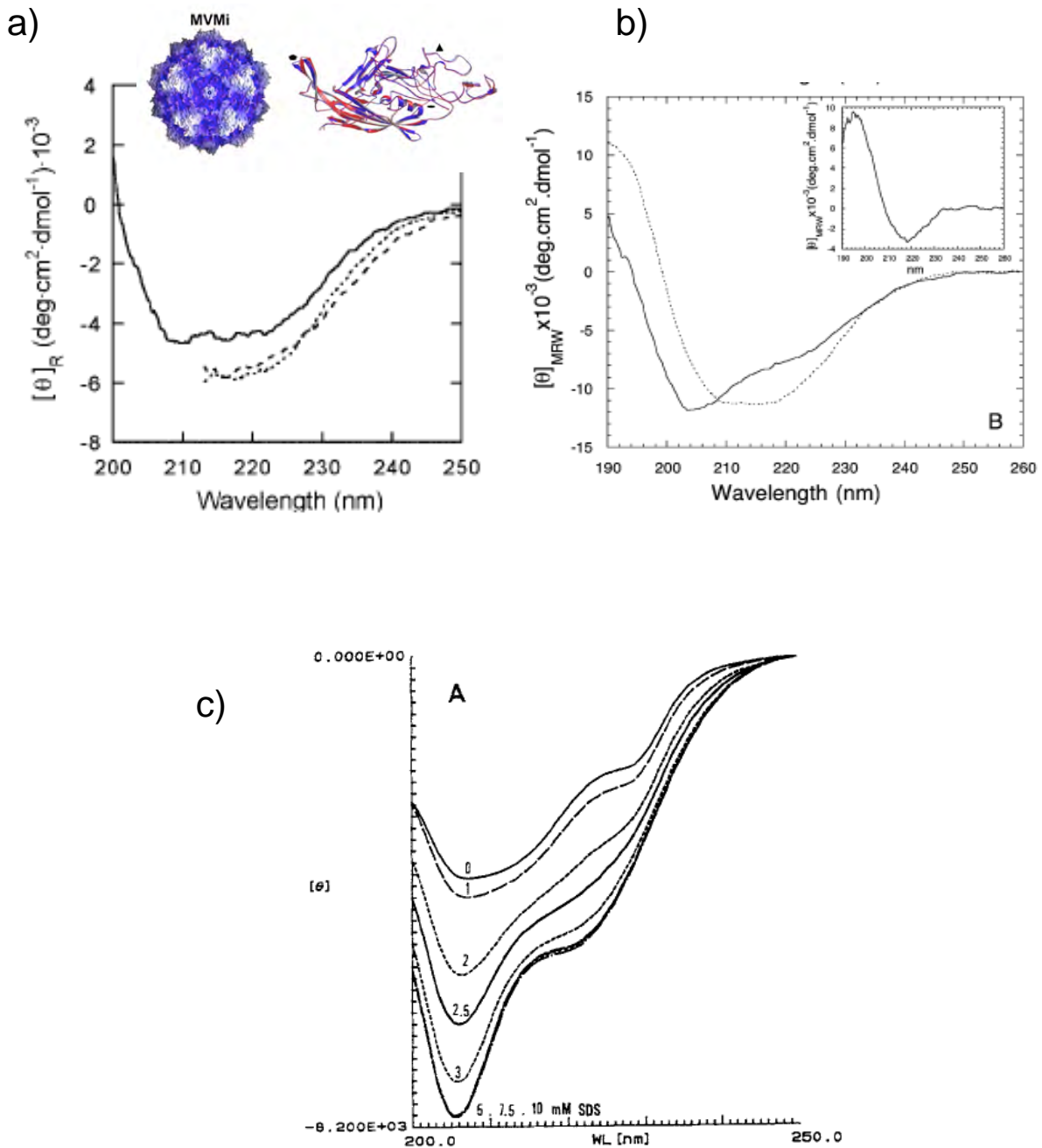
## Anexo 12



Esquema que muestra el efecto del SDS en la disociación de las partículas. Se propone que después del ensamble en PBS se obtienen VLPs agregadas y no proteína mal plegada.



## Anexo 13



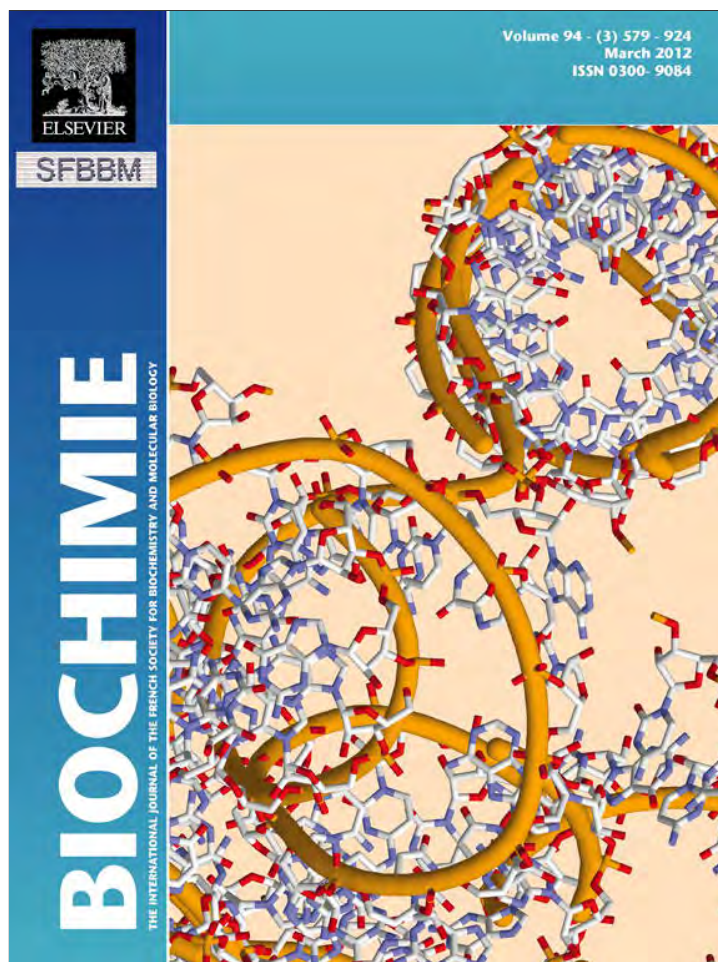
a) Estructura secundaria reportada para las VLPs del Parvovirus MVM (Carreira *et al.*, 2004). b) Espectro de dicroísmo circular reportado para los dímeros de la proteína E7 del virus HPV (línea continua) y para los oligómeros formados a partir de los dímeros de la proteína E7 (línea punteada) (Alonso *et al.*, 2004). c) Estructura secundaria reportada para PyVP<sub>1</sub>, en 10 mM de Tris con NaCl 30 mM, pH 7.2 y varias concentraciones de SDS (1 a 10 mM) marcadas en cada línea (Yang y Teng, 1998).



VLP	Tamaño	Sistema de expresión	Subunidad de ensamble	Condiciones de ensamble	Desensamble	Bibliografía
HPV	HPV18=60 nm HPV6,11,16=30-50 nm	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	Pentámeros	0.5-1 M NaCl pH 6-7, Tween 80, CaCl <sub>2</sub>	pH 8.2, 2mM DTT, 0.166 M NaCl, 1 h	Mach, et al 2006
HBV	28-32 nm	<i>Escherichia coli</i>	Dímeros CP149	50 mM HEPES pH 7.5, 2 mM DTT, 0.5 M NaCl	3 M urea, 1.5 h 4°C. Filtración en gel con 0.1 M NaHCO <sub>3</sub> , pH 9.6, 2 mM DTT	Zlotnick, et al, 2002.
BMV	30 nm	Plantas	Dímeros 180 subunidades con dímeros de 20 kDa	1) 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 10 mM KCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 7.4 2) 50 mM NaOAc, 8mM Mg(OAc) <sub>2</sub> , pH 4.5.	0.01 M Tris, 1 M KCl, 0.005M MgCl <sub>2</sub> , pH 7.4 Diálisis 24 h, 4 °C	Dixit et al., 2006
SV40	VLPs 24 nm Virus nativo 45 nm	<i>Escherichia coli</i>	VP1 Pentamers	10 mM Tris-HCl pH 7.2, 1 mM CaCl <sub>2</sub> , 250 mM NaCl, 5% glicerol. 20 h/4°C, con un cambio de amortiguador a las 10 h (12 ml de muestra en 1 L)	10 mM Tris-HCl pH 8.8, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, 30 mM, B-Mercaptoetanol, 5% glicerol	Li et al., 2009
CCMV	Diferentes tamaños y morfología en función del pH y fuerza iónica	Plantas	----	1) Remoción de DTT y PMSF por ultrafiltración en amortiguador de desensamble. 2) Diferentes condiciones de pH y fuerza iónica. 300 µL de muestra en 0.5 L de amortiguador durante 24 h a 4°C.	0.9 M NaCl, 0.02 M Tris-HCl pH 7.4, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF	Lavelle et al., 2009
Poliomavirus	45-50 nm	<i>Escherichia coli</i>	72 pentámeros de proteína VP1	1) 0.5 M sulfato de amonio, 20 mM Tris-HCl, pH, 7.4, 5% glicerol, 1 mM CaCl <sub>2</sub> 2) 200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5% glicerol, 1 mM CaCl <sub>2</sub> Centrifugación a 13,000 rpm por 30 min a 4 °C		Gleiter and Lilie, 2001.
SV40 Poliomavirus	45-50 nm ρ= 1.34 g/ml nativo ρ=1.29 g/ml VLPs	Baculovirus	VP1 72 pentámeros	1)Amortiguador de almacenamiento: 20 mM Tris-HCl pH 7.9, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl <sub>2</sub> 2)Amortiguador de ensamble: 20 mM, pH 5, 1 M NaCl at 4°C	2) Amortiguador de desensamble: 20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 1 M NaCl, 25 mM EGTA, 30 mM DTT, 37°C, 30 min	Kosukegawa et al., 1996
HBV	28-30 nm con 240 subunidades HBcAg. 24 nm con 180 subunidades HBcAg.	<i>Escherichia coli</i>	HBcAg	TBS: 0.1 M NaCl, 2 mM KCl, 25 mM Tris pH 7.4	Estudios con temperatura, SDS y mutantes	Newman et al., 2003
CPV	----	Baculovirus	VP2 60 subunidades formando trímeros	Buffer PBS, pH 7.4	Estudios con temperatura, tripsina y cloruro de guanidinio.	Carreira et al., 2004
HBV	36 nm con 240	<i>Escherichia coli</i>	HBcAg	1)Dilución con amortiguador de	0.25 mg/mL (0, 0.5, 1, 1.5, 2.0,	Lee et al., 2008

	subunidades de HBcAg 32 nm con 180 subunidades de HBcAg 26 nm con HBcAg incompleta.			diálisis: 50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl a 0.2 M urea.  2)Diálisis in el mismo amortiguador (1L, con 2 cambios) 12 h a 4°C	2.5, 3, 4, 5) 25 °C 3h 2.5 M urea	
HBV	-----	<i>Escherichia coli</i>	Cp149 120 dímeros y trímeros de dímeros	25µM de Cp149 <sub>2</sub> en 5 mM de HEPES pH 7.5, 2 mM DTT, 0.5 M NaCl a 4°C, 24 h.	Disociación en diferentes concentraciones de urea y NaCl in 50 mM de Tris-HCl pH 7.5 durante 24 h	Singh et al., 2003
CCMV	-----	<i>Escherichia coli</i>	Dímeros	1)0.02 M Tris-HCl pH 7.5, 1.0 M NaCl, 0.01 M DTT, 0.2 mM PMSF. 2) 50 mM NaOAc pH 7, 50 mM NaCl, 10 mM KCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF 3) Condiciones de ensamble: 0.1 M NaOAc pH 4.8, 0.1 M NaCl, 0.2 mM PMSF. 10-12 h/4°C	-----	Zhao et al., 1995
HPV Papilomavirus	60 nm		VP1 72 Pentámeros	Dilución (3-6 mg/mL) con amortiguador de citratos: 40 mM citrato de sodio, pH 5.2, 0.5 M NaCl.	Obtención de pentámeros en amortiguador Tris-HCl pH 8, 0.2 M NaCl, 10 mM DTT, 2mM EDTA	Casini et al., 2004.
HEV	30 nm	Baculovirus		1)Re-ensamble por incubación de las VLPs disociadas por 1 h, en la cual se incrementó la concentración de CaCl <sub>2</sub> a 5 mM. 2)Ultracentrifugación y resuspensión del pellet en amortiguador de Potasio-MES 10 mM pH 6.2.	Amortiguador Tris-HCl pH 7.5, 0.15 M NaCl, 1 mM EGTA, 20 mM DTT, 30 min.	Takamura et al., 2004.
HPV16 L1/L2		Baculovirus VLPs solubles en amortiguador PBS		Amortiguador PBS pH 7.4, 0.5 M NaCl, 2mM CaCl <sub>2</sub> , 4 L, 24 h/4°C, 1mg/mL de muestra	VLPs en PBS con 5% de 2-ME, por 16 h/4°C	Kawana et al., 1998.
SV40	45-50nm	Baculovirus	VP1 72 Pentámeros	1) Proteínas en Tris-HCl 20 mM, pH 7.9, 10% de glicerol, 100 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 0.1% Nonidet P-40, 0.5 mM DTT, 2 mM PMSF 2) Ensamble en amortiguador con 0.15 M de NaCl y 2 mM de CaCl <sub>2</sub> a diferentes pHs. 16 h/22°	Obtención de pentámeros en 20 mM de Tris-HCl pH 7.9, 100 mM NaCl, 0.1% Nonidet P-40, 25 mM EGTA, 30 mM DTT. 1h/37°C	Kawano et al., 2006.
Parvovirus B19	18-28nm	Baculovirus	----	VLPs solubles en amortiguador PBS pH 7.9 o en Tris-HCl pH 8.	-----	Kajigaya et a., 1991.

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biochi](http://www.elsevier.com/locate/biochi)

Research paper

## Human parvovirus B19 virus-like particles: *In vitro* assembly and stability

Sandra P. Sánchez-Rodríguez<sup>a</sup>, Lucía Münch-Anguiano<sup>a</sup>, Olga Echeverría<sup>b</sup>, Gerardo Vázquez-Nin<sup>b</sup>,  
Mauricio Mora-Pale<sup>c</sup>, Jonathan S. Dordick<sup>c,d,e</sup>, Ismael Bustos-Jaimes<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

<sup>b</sup>Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

<sup>c</sup>Department of Chemical and Biological Engineering, Center for Biotechnology and Interdisciplinary Studies, Rensselaer Polytechnic Institute, Troy, NY, USA

<sup>d</sup>Department of Biomedical Engineering, Center for Biotechnology and Interdisciplinary Studies, Rensselaer Polytechnic Institute, Troy, NY, USA

<sup>e</sup>Department of Biology, Center for Biotechnology and Interdisciplinary Studies, Rensselaer Polytechnic Institute, Troy, NY, USA

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 12 August 2011

Accepted 7 December 2011

Available online 14 December 2011

#### Keywords:

Virus-like particles

Protein refolding

Nanotechnology

Virus structure

### ABSTRACT

Virus-like particles (VLPs) are biological nanoparticles identical to the natural virions, but without genetic material. VLPs are suitable for the analysis of viral infection mechanisms, vaccine production, tissue-specific drug delivery, and as biological nanomaterials. *Human parvovirus B19* (B19) infects humans; therefore VLPs derived from this virus have enormous potential in medicine and diagnostics. Current production of self-assembled VLPs derived from B19 is typically carried out in eukaryotic expression systems. However many applications of VLPs require access to its internal core. Consequently, the processes of disassembly and further reassembly of VLPs are critical both for purification of viral proteins, and for encapsulation purposes. Herein we report the *in vitro* self-assembly of B19 VLPs derived from the recombinant VP2 protein expressed in *Escherichia coli* and the effects of pH and ionic strength on the assembly process. Our results demonstrate that VP2 is able to form VLPs completely *in vitro*. At neutral pH, homogeneous VLPs assemble, while at acidic and basic pHs, with low ionic strength, the major assemblies are small intermediates. The *in vitro* self-assembled VLPs are highly stable at 37 °C, and a significant fraction of particles remain assembled after 30 min at 80 °C.

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## 1. Introduction

Viruses are parasitic supramolecular assemblies composed of a protein shell, or capsid, that encloses RNA or DNA. These naturally occurring nanoparticles have evolved to efficiently deliver their genetic material and to generate infectious progeny inside specific cells. The success of viruses as delivery vectors has attracted significant attention in biomedicine, biotechnology, and nanotechnology [1–5]. Capsid protein surface residues can be chemically functionalized, and this has been exploited in a broad array of applications [6–8]. Nevertheless, use of viruses as tools in nanotechnology or biomedicine may ultimately be limited by concerns over their natural pathogenicity and recombinogenic properties. In contrast, virus-like particles (VLPs), which consist of the capsid without core genetic material, are non-infective. VLPs have been produced for more than 30 different viruses that infect humans and

others animals [9], and constitute simple models from which to study the mechanism of virus assembly and infection [10], as well as the basis for marketing vaccines [5,11,12].

VLPs are produced through the expression and spontaneous assembly of capsid proteins [13]. Despite the high efficiency of the self-assembly process inside cells of eukaryotic heterologous expression systems, many biomedical and biotechnological uses of VLPs require the elimination of potential contaminants from its internal core. A simple strategy to remove such contaminants is to disassemble the VLPs prior to a purification step followed by reassembly of the particles. These additional steps of disassembly and reassembly may limit the advantages of eukaryotic heterologous expression. In addition to the involved operational cost of such steps, some VLPs are difficult to be reassembled *in vitro*. Moreover, if the internal core is intended to transport active biomolecules, such as proteins, access to this space must also be achieved. The process of VLPs reassembly from its capsomers may be prone to misfolding and aggregation [14]. It has been observed that heterologous expression of capsid proteins in bacteria often results in formation of inclusion bodies [13,15]. Only for a few viruses is VLP assembly easily modulated *in vitro* by the presence of cations [16] or by controlling the redox potential [17]. The factors affecting

\* Corresponding author. Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad Universitaria, Mexico City 04510, Mexico. Tel.: +52 55 56232260; fax: +52 55 56162419.

E-mail address: [ismaelb@unam.mx](mailto:ismaelb@unam.mx) (I. Bustos-Jaimes).



VLPs assembly can be different from virus to virus. Is it possible, however, to systematically analyze the influence of multiple factors during the production of VLPs [18]. Currently, the production of VLPs from proteins expressed in bacteria as inclusion bodies have been reported, demonstrating their biological value as carriers for immunological epitopes [19].

*Human parvovirus B19* (B19) is a small icosahedral virus (18–26 nm) that belongs to the Parvoviridae family and is the best-characterized member of this family that infects humans [20–22]. B19 is the etiological agent of erythema infectiosum in children, aplastic crises in immunocompromised patients, and miscarriage and non-immune hydrops fetalis in pregnant women [23,24]. B19 displays a remarkable tissue-tropism for human hematopoietic cells of the erythroid lineage. From a structural standpoint, B19 provides an excellent model for studying icosahedral virus assembly, capsid stability, and disassembly. B19's capsid is formed from 60 subunits of only two proteins, VP1 (5% abundance) and VP2 (95% abundance), which are identical in their sequence except for an extra sequence of 227 amino acids at the VP1 N-terminus [25]. VLPs of B19 have been produced through the heterologous expression of either VP1 and VP2 or only VP2 proteins in insect cells or yeast [26–28]. B19 VLPs have been successfully used as carriers of immunogenic epitopes of dengue virus [29], human herpes simplex virus, and mouse hepatitis virus [30], demonstrating its potential for biomedical applications. Although heterologous expression in eukaryotic hosts is well established, access to the inner core of VLPs cannot be exploited without efficient reassembly methods. Herein, we describe the high-level expression of B19-VP2 in *Escherichia coli* and the purification and *in vitro* assembly to form VLPs. In addition, we identify key factors (pH, ionic strength, and temperature) that influence assembly yield and stability of the VLPs produced.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and biochemicals

Most chemicals and culture media were purchased from Sigma. Restriction enzymes, T4 DNA ligase, and *Pfu* polymerases were purchased from New England Biolabs. Anti-parvovirus B19 antibody was purchased from Chemicon-Millipore.

### 2.2. B19-VP2 cloning, expression and purification

VP2 gene was chemically synthesized (Epoch Biolabs) taking into account the codon usage of *E. coli* (Supplementary material, Seqs. 1 and 2). The sequence coding for VP2 was inserted into the *Nde*I and *Xho*I sites of pET22b+ (Novagen) to generate the plasmid pETVP2. This construction also codes for a 6xHis tag fused to the C-terminus of VP2 to simplify protein purification. Transfected *E. coli* BL21 (DE3) cells (Novagen) were cultured in LB broth containing ampicillin (50 µg/mL) at 37 °C to mid-exponential phase ( $A_{600} = 0.6$ ), at which point isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to a final concentration of 0.25 mM, and the cultures were incubated for an additional 12 h. Cells were harvested by centrifugation at 5000 × g at 4 °C for 20 min. The cell pellet was resuspended in lysis buffer (0.3 M NaCl, 50 mM sodium phosphate, pH 6.3) and then lysed by sonication using 9.5 s pulses with 5 s off during 15 min in iced water bath. Recombinant VP2 forms inclusion bodies, as has been reported for other viral proteins in prokaryotic heterologous systems [31–33]. Therefore, cell debris and inclusion bodies were collected by centrifugation at 5000 × g for 20 min at 4 °C. The inclusion bodies containing VP2 were washed three times with buffer A (50 mM sodium phosphate, pH 6.3, 0.3 M NaCl, 2% Triton X-100, 3 M urea), one time with buffer A

added with 5 mM DTT, and finally with lysis buffer. The remaining pellet was solubilized in 90 mL of column buffer (6 M guanidine hydrochloride (GuHCl), 0.3 M NaCl and 50 mM sodium phosphate, pH 6.3) and incubated for 24 h at 180 rpm and 37 °C. Insoluble protein was removed by centrifugation in a Sorvall Centrifuge with a GS-3 rotor at 8000 × g for 30 min at 20 °C and further micro-filtration through a 0.22 µm membrane. Purification of His-tagged VP2 protein was performed via affinity chromatography under denaturing conditions. A column with 20 mL of Protino Ni-TED (Macherey Nagel) resin was equilibrated with column buffer and loaded with the sample at a flow rate of 2 mL/min. The column was washed with two volumes of column buffer and two volumes of column buffer added with 20 mM imidazole. The protein was eluted with elution buffer (6 M GuHCl, 0.3 M NaCl, 50 mM sodium phosphate, 500 mM imidazole, pH 6.3) and collected in 5 mL fractions. Aliquots of the fractions were dialyzed to remove the denaturing agent prior to SDS-PAGE (Supplementary material, Fig. S1B). Fractions containing the pure proteins were pooled and then concentrated with centrifugal filter units (Millipore) in a 50-kDa molecular weight cutoff membrane. In this step the buffer was changed to solubilization buffer (5 M GuHCl, 20 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 8). Purity of VP2 was determined by densitometric analysis using ImageJ 1.44 software [34].

### 2.3. Western blot

Samples of protein (10 µg) were separated by 12.5% SDS-PAGE followed by electrophoretic transfer to PVDF membranes. The membrane was blocked with TBS/5% non-fat dry milk (Bio Rad) and incubated 1 h at room temperature with the primary antibody (Anti-Parvovirus B19 clone R92F6, Chemicon-Millipore). Detection was achieved using the Supersignal kit (Pierce) with a horseradish peroxidase-conjugated second antibody.

### 2.4. *In vitro* assembly of VLPs

Capsid assembly was carried out by dialyzing 1.3 mL of protein (0.5 mg/mL) three times against 50 mL of buffer at a given ionic strength (0, 0.25, 0.5, 0.75 M), pH (4.0, 5.5, 7.0, 8.5) and temperature (4 and 37 °C) for 12 h. NaCl was used to adjust the ionic strength. Acetate, phosphate, or Tris buffers were used to test the assembly under acidic, neutral or basic conditions, respectively. After dialysis samples were microfiltered through a 0.22 µm membrane and the proportion of soluble protein recovered was estimated by the bicinchoninic acid assay (BCA). The same procedure was followed to study the assembly in phosphate buffered saline (PBS) solution (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.76 mM, pH 7.4).

### 2.5. Characterization of VLPs

After assembly, VLPs were separated in continuous CsCl gradients (1.33 g cm<sup>-3</sup> in 50 mM of the same buffer used during the assembly, with 10 mM EDTA and 0.5% Triton-X) [28]. Ultracentrifugation was carried out in a Beckman Optima XL90 Ultracentrifuge using an SW 60 Ti rotor at 483,750 × g for 9 h at 20 °C. Prior to further analysis, protein bands obtained in the gradient were recovered and dialyzed against the same pH buffer used during the assembly to remove the CsCl. Protein concentrations in the bands were quantified by the BCA method. Bands were analyzed by Transmission Electron Microscopy (TEM) and Dynamic Light Scattering (DLS) to determine the presence of VLPs and/or their intermediate assemblies.



For TEM analysis, samples were absorbed on Formvar-coated copper grids for 5 min. Excess sample was then removed by blotting with filter paper. The grid was negatively stained with 3% of phosphotungstic acid (pH 7.0) for 5 min. Excess colorant was removed by blotting with filter paper. The grids were examined in a transmission electron microscope (JEOL JEM-1010) at 80 kV. The micrographs were taken at appropriate magnifications. DLS measurements were performed using a Zetasizer  $\mu$ V equipped with a photodiode laser (830 nm). Dispersant refractive index and viscosity were assumed to be 1.33 and 1.003 cP, respectively [35]. The samples were run in appropriate buffer and the protein concentration was adjusted between 0.1 and 0.3 mg/mL. DLS values for each sample were averaged over 10 runs of 10 measurements per run at the indicated temperature.

Sedimentation velocity analysis was performed with a Beckman Optima XL-I analytical ultracentrifuge equipped with an AN-50Ti rotor (Beckman). Samples of 400  $\mu$ L at specific conditions of pH (acetate buffer pH 4 20 mM with NaCl 0.25 M or Tris–HCl buffer pH 8.5 with NaCl 0.5 M) and protein concentration (0.1–0.3 mg/mL) were placed in the sample compartment and 400  $\mu$ L of buffer was placed in the reference compartment. The analysis was performed at 20 °C and a constant speed of 10,000 rpm (8042  $\times$  g) for 24 h. Sedimentation patterns were recorded every 10 min with an UV scanner at 280 nm. Apparent sedimentation coefficients were calculated using the SEDIFT program.

### 2.6. Stability of B19-VP2 VLPs

The effect of temperature on VLPs was evaluated by measuring changes in the mean effective diameter of VLPs by DLS. Ten measurements were taken every 10 °C in the range of 20–90 °C. The kinetics of VLP size change were followed at specific temperatures (30, 40, 50, 60 and 80 °C). Five measurements were taken every minute over a 35 min period. Finally, samples incubated at 30, 40, 60 and 80 °C for 30 min were analyzed by TEM as described above.

The effect of SDS on the aggregative properties and stability of VLPs was analyzed by DLS, size exclusion chromatography (SEC), and circular dichroism (CD) spectroscopy. Samples containing VLPs were microfiltered through a 0.22  $\mu$ m membrane and exposed to different concentrations of SDS, from 0.01 to 0.10%. Time courses of turbidity at 600 nm were measured in a plate reader over a 25 min period. Changes in particle diameter were monitored by DLS by taking five measurements every minute over a period of 20 min. Samples exposed to SDS were also analyzed by SEC on a Superdex 200 column equilibrated either with PBS buffer or 20 mM acetate buffer, pH 4, with 0.25 M NaCl, both added with 0.05% of SDS. Elution of the protein was monitored at 280 nm. The column was calibrated with the following standard globular proteins: BSA (66 kDa),  $\beta$ -amylase (200 kDa), apoferritin (443 kDa), and thyroglobulin (669 kDa). The void volume was determined by loading Blue Dextran (MW 2000 kDa). Analyses of samples by CD were performed on a Jasco J-715 spectropolarimeter, using a sensitivity setting of 20 mdeg and a response time of 8 s. Spectra (three accumulations) were obtained at a scan rate of 20 nm/min at 25 °C in a 0.1 cm path-length cell. Protein concentration was maintained between 0.1 and 0.3 mg/mL either in PBS or in 20 mM acetate buffer, pH 4, with 0.25 M NaCl.

## 3. Results

### 3.1. B19-VP2 expression and purification

Recombinant VP2 (containing a C-terminal 6-His tag) was expressed in *E. coli* in the form of insoluble inclusion bodies

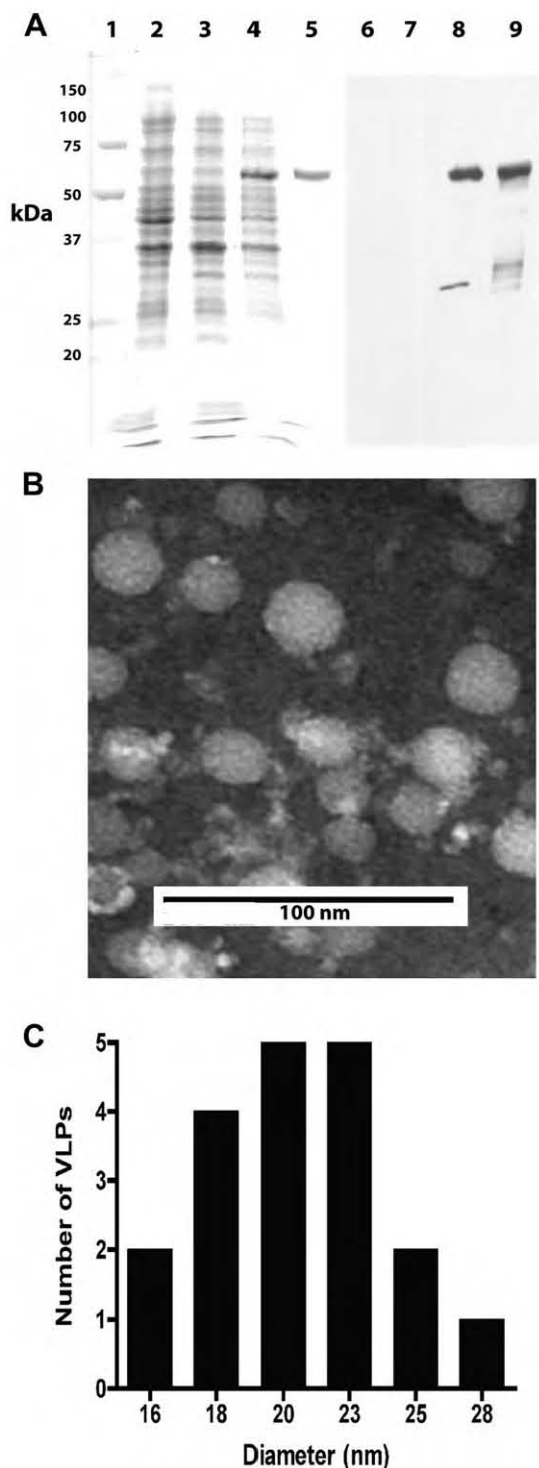
(Supplementary material, Fig. S1A). Several conditions for expression were evaluated to avoid the formation of inclusion bodies. However, different temperatures, incubation times, or IPTG concentrations did not improve the yields of soluble VP2. The inclusion bodies were solubilized in 6 M GuHCl and purified by affinity chromatography. The purification yield ranged from 50 to 70 mg of protein per liter of culture medium (Supplementary material, Fig. 1SC). Average purity of VP2 was 95% as indicated by densitometric analysis (Fig. 1A). Identity of the purified protein was verified by western blot analysis using an anti-parvovirus B19 antibody (Fig. 1A).

### 3.2. Effect of pH, ionic strength and temperature on B19-VP2 VLPs assembly

Denatured VP2 was used as starting material for refolding and assembly of B19-VP2 VLPs. Successful refolding of proteins is affected by several factors, including the solubilization process, the removal of denaturant, and the assistance of small molecule additives [36–39]. Several conditions were tested for the solubilization of inclusion body proteins, including the addition of denaturants such as urea (8 M) and GuHCl (5 M) for 24 h at 37 °C. Urea partially solubilized VP2-inclusion bodies, while GuHCl completely solubilized the protein. VLPs were, therefore, obtained from GuHCl-denatured VP2 (Fig. 1B) by removing the denaturing agent using dialysis against different buffers at 4 °C. The principal species display diameters of 18–26 nm and structural features similar to those previously reported for B19 VLPs (Fig. 1B and C) [40–42]. Therefore, we used VP2 solubilized in 5 M GuHCl for subsequent studies.

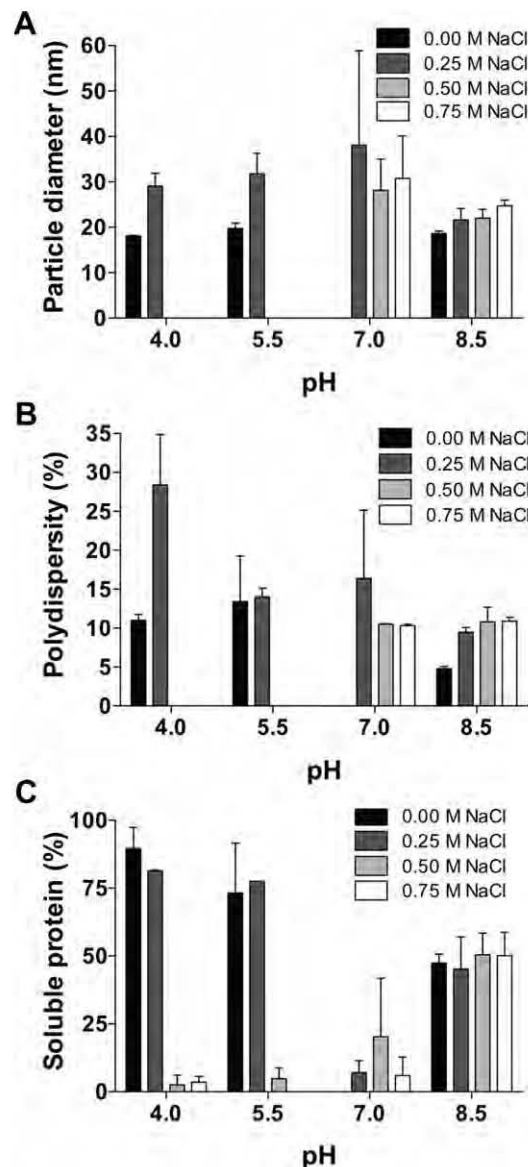
The presence of B19-VP2 VLPs, after dialysis step at neutral pH and 0.5 M NaCl, resulted in a turbid solution. This turbidity was not originated from misfolded protein as demonstrated by TEM (Supplementary material, Fig. S2). In contrast, B19-VP2 VLPs in absence of NaCl coalesced into large and insoluble clusters or precipitates that could not be analyzed by DLS (Fig. 2A). VP2 solutions were not turbid at pH values of 4.0, 5.5 and 8.5, all at low ionic strength. In agreement with this observation, DLS analyses indicated that the mass fraction of VP2 forming VLPs was minimal compared to the large amount of small VLP intermediates observed (Fig. 2A), and the amount of soluble protein recovered after dialysis was high compared to that recovered at neutral pH (Fig. 2C). These results were also corroborated by analytical ultracentrifugation and TEM (Supplementary material, Fig. S3). In contrast, a large amount of VLPs was observed at pH 7.0, while the soluble protein remained low because of the coalescence of VLPs (Supplementary material, Fig. S2). When the intermediates obtained either at acidic or basic conditions were dialyzed against the buffer at pH 7.0, the turbidity and the number of VLPs increased dramatically and was comparable to that found for the direct dialysis at pH 7.0 (Supplementary material, Fig. S4A and B). This result agrees with an increased density of the protein bands observed in CsCl gradients when the pH was changed to pH 7 (Supplementary material, Fig. S4C).

An increase in the ionic strength (0.25 M of NaCl) at pH 4.0 or 5.5 produced an increase in particle size as measured by DLS (Fig. 2A and B). Nevertheless, the amount of VLPs produced under these conditions remained low compared with the high amount of VLPs obtained at pH 7. The high polydispersity of the sample at pH 4.0 indicated the likelihood of multiple species being present (Fig. 2B). Such heterogeneity was confirmed by TEM (Supplementary material, Fig. S3). Concentrations of NaCl > 0.25 M at acidic pH resulted in protein aggregation. In contrast, at pH 7.0 the addition of NaCl did not significantly increase or decrease the amount of soluble protein (Fig. 2C).



**Fig. 1.** (A) SDS-PAGE analysis of purification steps of VP2 (60 kDa); lane 1, MWM; lane 2, intracellular proteins of *E. coli* BL21 (DE3); lane 3, intracellular proteins of *E. coli* BL21 (DE3) transformed with pETVP2 before induction with IPTG; lane 4, intracellular proteins of *E. coli* BL21 (DE3) transformed with pETVP2 after 4 h of induction with IPTG; lane 5, purified protein; lanes 6–9, western blot analysis of samples in lanes 2–5, respectively. (B) TEM analysis of VLPs assembled by dialysis at pH 7.0, 4 °C, and 0.5 M NaCl. (C) Size distribution from panel B.

The effect of temperature on the self-assembly of B19-VP2 VLPs was evaluated in PBS at 4 and 37 °C. The lower temperature was chosen not only because of the observed success in our previous experiments, but because it may reduce the rate of undesirable side



**Fig. 2.** Effect of pH and ionic strength on VLPs assembly. (A) Diameter of the main species by DLS at 25 °C. (B) Soluble protein after sample microfiltration through a 0.22 µm cutoff membrane. (C) Polydispersity of the peaks in shown in panel A. VLPs were assembled from 5 M GuHCl–denatured VP2 at 4 °C.

processes, as aggregation and other chemical degradation of proteins; in contrast, 37 °C was selected because B19 is a human parasite that completes its life cycle at this temperature, thereafter it is reasonable that self-assembly might proceed under this condition. Samples were analyzed by TEM, DLS and ultracentrifugation (Table 1). Turbidity appeared after dialysis, and TEM analysis revealed the presence of VLPs at both temperatures (Supplementary material, Fig. S5). It is noteworthy that at 37 °C turbidity was more prominent than at 4 °C and only 3.2% of the protein was recovered after filtration through a 0.22 µm membrane. The sample assembled at 4 °C produced two bands in CsCl gradients, one corresponding to the density of 1.28 g/mL (50.8% of VP2), which has been associated to B19 VLPs [28], and the other at a density of 1.22 g/mL (24.4% of VP2) that is similar to the band obtained during dialysis in acetate buffer pH 4 at 4 °C (Supplementary material, Fig. S5). DLS analysis of both bands revealed that the first band corresponds to VLPs, while the second

**Table 1**  
Effect of temperature on the self-assembly of B19-VP2 VLPs in PBS (pH 7.4)

Temperature (°C)	Protein concentration (%) after filtration	Protein concentration (%) in band 1 <sup>a</sup> of CsCl gradient	Protein concentration (%) in band 2 <sup>a</sup> of CsCl gradient	Size by TEM (nm)	Size by DLS <sup>b</sup> (nm)
4	32.9 ± 2.6	50.8 ± 3.9	24.5 ± 3.3	20–25	23.4 ± 6.8
37	3.2 ± 0.3	57.0 ± 0.8	NP	19–25	20.5 ± 1.4

NP: band not present.

<sup>a</sup> Bands 1 and 2 correspond to densities of 1.28 and 1.22 g/mL respectively (Fig. S5).

<sup>b</sup> Size for the main species found in protein after filtration (Fig. S5).

band is composed of smaller species that may be comprised of assembly intermediates or single capsomers, but not VLPs (size by DLS ~14–17 nm). TEM analysis of the first band confirmed the presence of VLPs (Supplementary material, Fig. S5D). The missing protein (about 25% w/v) was distributed along the CsCl gradient and in large precipitates at the bottom of the centrifugation tube. At 37 °C the first band also appears and contains 57% of VP2, whereas the second band is not present. Most of the missing protein formed a precipitate in the bottom of the centrifuge tube. Although assembly at 37 °C produces VLPs, the observed behavior suggests that this temperature induces higher aggregation of VLPs and reduces the yield of assembly versus 4 °C.

The effect of protein concentration during assembly was also studied because oligomerization and aggregation of proteins usually is controlled by concentration. Our results indicate that protein concentrations between 0.25 and 1.5 mg/mL did not impact the yield of soluble VLPs (Supplementary material, Fig. S6). Concentrations >0.5 mg/mL resulted in large protein aggregates that suggest protein misfolding. Finally, small molecule additives were studied for their effect on self-assembly. Glycerol, citric acid, CaCl<sub>2</sub>, and DTT did not increase the yield of soluble VLPs when used either during or after the assembly process.

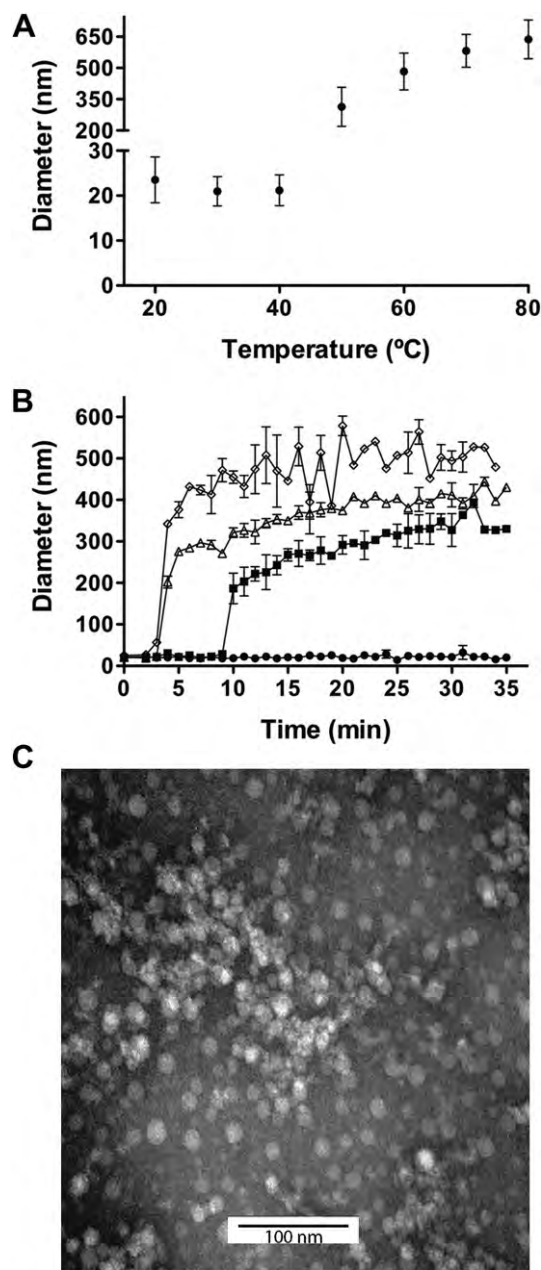
### 3.3. Stability of B19-VP2 VLPs

The thermal stability of VLPs produced in PBS at 4 °C was determined by incubating VLPs at different temperatures and analyzing changes in size and morphology via DLS and TEM. From 20 to 40 °C the VLPs were stable and retained their native size (Fig. 3A). Above 40 °C an increase in particle size was observed, indicating aggregation of the VLPs. The instability of VLPs at 40 °C or higher is clearly seen in Fig. 3B. At 40 °C, VLP aggregation occurs in roughly 10 min, and the aggregation phenomenon is accelerated at 50–60 °C with aggregation becoming evident even after 3 min. TEM analysis of the samples incubated from 40 to 80 °C revealed the presence of large protein aggregates as well as VLPs (Fig. 3C). These results are in agreement with the high stability reported for other capsids from members of the Parvoviridae family [19].

We attempted to disaggregate the VLP clusters by adding small concentrations of SDS. Turbidity was reduced (Fig. 4A) and completely disappeared within 10 min at 0.03% SDS. Analyses by ultracentrifugation, DLS, and SEC indicated that a large fraction of VLPs treated with SDS were disrupted to form heterogeneous species with sizes smaller than VLPs (Fig. 4B). These species strongly resembled those obtained either at pH 4.0 or 8.5. SEC analysis of the species obtained with 0.05% SDS revealed an apparent molecular weight 2–3 times higher than that expected for a capsomer unit (180 kDa for a trimer). DLS revealed that incubation with 0.1% of SDS for 30 min was sufficient to disrupt ~90% of the VLPs into small species <20 nm in diameter (Fig. 4C).

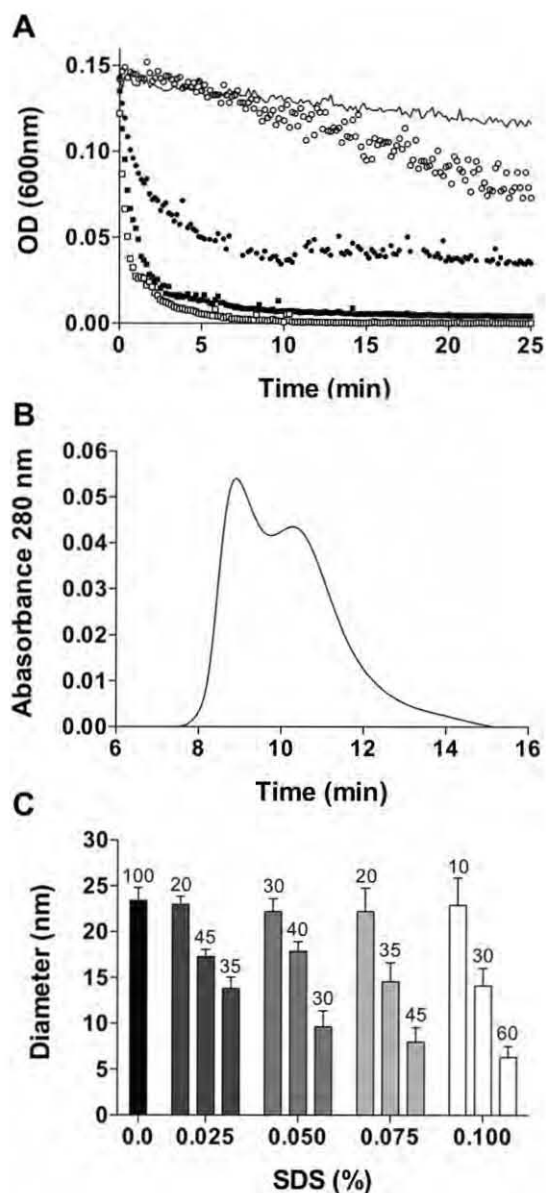
CD spectra of soluble VLPs in PBS and the oligomers obtained at pH 4.0 (Fig. 5A) are in agreement with the reported secondary structure of VP2, which is primarily composed of β strands connected by large loops (Fig. 5B). Exposition to 0.05% SDS induced marked conformational changes in the secondary structure of VLPs

and oligocapsomers at pH 7.4 and 4.0, respectively. The species obtained share similar structural properties and their CD spectra indicate that the content of the different types of secondary structure varied considerably upon addition of the surfactant,



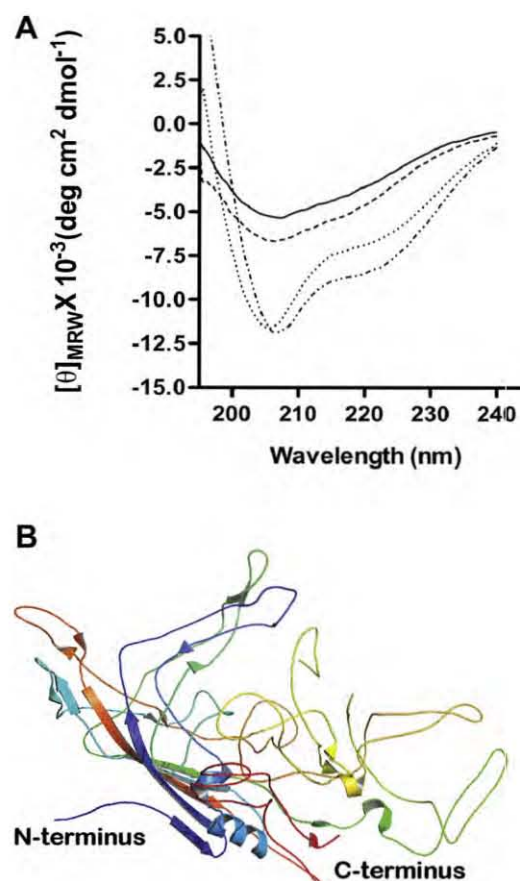
**Fig. 3.** Thermal stability of B19-VP2 VLPs in PBS. (A) Changes in diameter of VLPs with temperature by incubation for 5 min. (B) Effect of temperature on the diameter of VLPs at 30 °C (●), 40 °C (■), 50 °C (△) and 60 °C (◇). (C) Transmission electron micrograph of B19-VP2 VLPs exposed to 80 °C during 30 min. Intact VLPs and protein aggregates are detected.





**Fig. 4.** Effect of SDS on B19-VP2 VLPs stability in PBS. (A) Time course of optical density decrease at 600 nm produced by 0% (—), 0.01% (○), 0.02% (●), 0.03% (■), and 0.04% (□) SDS. (B) SEC profile of B19-VP2 VLPs exposed to 0.05% SDS for 30 min. Sample was analyzed on a Superdex 200 size exclusion column equilibrated with PBS added with 0.05% SDS. The first peak corresponds to the void volume of the column, which contains VLPs, while the maximum of the second peak corresponds to a MW of 600 kDa. This high MW indicates species larger than capsomers and smaller than VLPs; the asymmetry of the second peak indicates species of heterogeneous hydrodynamic radius. (C) Effect of SDS on the size and mass fraction of different species produced by disassembly of B19-VP2 VLPs. Numbers on the bars indicate percentage of each species. Samples were exposed to SDS for 20 min before DLS analysis.

principally with an increase of a spectral minimum between 205 and 207 nm. It has been demonstrated that SDS promotes the helicity of the protein VP1 from polyomavirus and many other proteins in aqueous solution [43]. While the double trough between 200 and 250 nm is distinctive of  $\alpha$ -helical structure, the absence of symmetry indicates the contribution of other structural motifs to the spectrum. Differences between CD spectra at pH 7.4 and 4.0, in the absence of SDS, are representative of structural rearrangements produced by the association of VP2 protein into VLPs or oligocapsomers.



**Fig. 5.** Structural analysis of B19-VP2 VLPs. (A) Far-UV CD spectra of particles assembled in acetate buffer, pH 4.0, with 0.25 M NaCl (solid line); CD spectra of particles assembled in PBS buffer pH 7.4 (dashed line); CD spectra of particles assembled in PBS and exposed to 0.05% of SDS for 20 min (dotted line); CD spectra of particles assembled in acetate buffer, pH 4.0, with 0.25 M NaCl and exposed to 0.05% of SDS for 20 min (dot-dot dashed line). (B) Cartoon representation of the structure of VP2 (Protein Data Bank code 1S58), which is composed primarily of an eight-stranded antiparallel  $\beta$ -barrel, coils, and surface loops.

#### 4. Discussion

B19-VP2 was efficiently expressed in *E. coli* as inclusion bodies in only 12 h. Purification of VP2 by affinity chromatography under denaturing conditions resulted in high protein yields of up to 70 mg/L. Moreover, the yield of VLPs assembled starting from VP2 with a C-terminal His tag was comparable to the non His-tagged VP2. This provides an alternative to other heterologous expression systems, such as yeast or insect cells, for the production of B19-VP2 VLPs. This ease of expression and purification of VP2 may represent an advantage for future biomedical applications of B19-VP2 VLPs. The ability of VP2 to self-assemble following complete denaturation in 6 M GuHCl has not been observed for other VLPs, which are far less resistant to strong denaturants. For example, Lee and Tan reported that the hepatitis B core antigen loses its ability to self-assemble after exposure to 3.0 M GuHCl for short-time periods [44].

Assembly of VLPs is a complex process, which depends on pH, ionic strength, and the presence of low molecular weight solutes. Effects of temperature, pH, and ionic strength individually have been described for the self-assembly of capsid proteins of the cowpea chlorotic mosaic virus (CCMV), which is known to exist in many distinct polymorphic architectures [37]. The effects of temperature, pH, and ionic strength also have been predicted for

viral proteins and other materials following self-assembly processes [45–47]. The mechanism of assembly of many icosahedral viruses from capsomers to full capsids is known to involve the formation of intermediate subassemblies [47]. In the current study, we observed structural subassemblies during *in vitro* B19-VP2 VLPs assembly. The major species observed by TEM at pH 4.0 and 8.5 had diameters from 9 to 16 nm, which may correspond to capsomers or small oligocapsomers. More remarkable is the observed pH-induced assembly of these species by changing the pH to 7.0 or 7.4 (PBS). This effect was irreversible and indicates the participation of ionizable groups at the interfaces between capsomers. The apparent irreversibility of the pH-induced assembly suggests that such groups are buried following assembly; consequently post-assembly pH changes cannot reverse the ionization states.

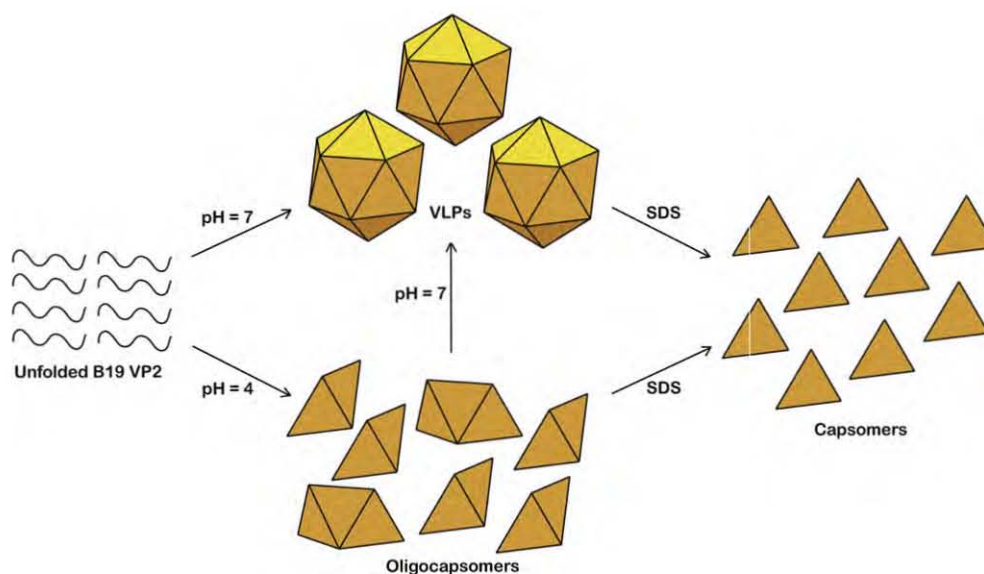
Salt can modify the structural stability of proteins mainly by shielding ionic interactions, thereby stabilizing or destabilizing different charge distributions on the surface of proteins [48]. The interaction between capsid proteins and its nucleic acid is critical for the correct assembly of virion particles [49,50]. In VLPs, the absence of the negatively charged nucleic acid may influence correct capsid assembly. Therefore, the critical role of salt observed in the assembly of B19-VP2 VLPs is not surprising. Under acidic conditions, an increase from 0 to 0.25 M NaCl during assembly produces a significant increase in particle size, while higher salt concentrations induced a strong aggregation of the particles, making them unsuitable for DLS analysis. In contrast, at pH 8.5, high salt concentration promoted the formation of VLPs, although a significant fraction of protein remained in soluble form. Nevertheless, this soluble fraction contained a large fraction of assembly intermediates (Supplementary material, Fig. S3). At pH 7.0, close to the physiological pH at which B19 self-assembles, ionic strength is critical for the appearance of soluble VLPs. In the absence of NaCl, the VLPs produced cannot be analyzed by DLS because of its high propensity to precipitate. This is in agreement with the results observed in PBS in which VP2 self-assembles into VLPs and only a small fraction of protein forms misfolded protein aggregates.

In addition to the formation of precipitates at pH 7.0 or 7.4, significant protein aggregation occurs during VLPs assembly at 37 °C. This aggregation suggests that, aside from pH-dependent interactions, hydrophobic interactions among protein molecules

occur. While the pH-dependent interactions occur between capsomers, entropic interactions may also take place among VLPs, therefore producing the observed insoluble clusters of VLPs, which behave as colloidal particles. In addition, the predicted isoelectric point [51] of VP2 is 6.5, thus contributing to its precipitation in solutions near pH 7.0.

Most VLPs incubated at 80 °C for 30 min preserved their structural integrity, as observed by TEM, demonstrating the high thermostability of these particles. Although to our knowledge the disassembly of B19 capsids by temperature has not been reported, its infectivity can be lost by incubation at 60 °C for 12 min [52,53]. This loss of infectivity, however, may not be related to capsid disruption. In agreement with the high thermal stability of B19-VP2 VLPs, other empty capsids of Parvoviridae family dissociate at temperatures close to 80 °C in physiological buffers [10]. In contrast, small concentrations of SDS were enough to reduce the size of the VLP clusters and then to disassemble VLPs into oligocapsomers, capsomers, and even subunits of VP2. A similar effect has been observed for species obtained by treatment with urea or by pH change in the canine parvovirus VLPs [47]. The observed SEC profile of VLPs assembled in PBS at 4 °C and treated with 0.05% SDS is similar to that obtained for VP2 dialyzed against acetate buffer at pH 4.0. DLS results also suggest that the species obtained in 0.05% SDS may be the same as those observed at pH 4.0.

In contrast, CD spectroscopy reveals that SDS produces more intense structural changes than those produced only by the self-assembly. Thereafter, SEC and CD results indicate that association of capsomers in oligomeric species is not totally abolished by the structural changes produced by SDS. The subtle differences in CD spectra in the absence of SDS indicate the structural consequences of the assembly of capsomers into VLPs. These changes are likely to occur in loops surrounding the capsomers, whose structure is difficult to assign to a specific wavelength. This evidence is consistent with the observation that at pH 4.0, B19-VP2 forms capsomers or oligocapsomers, which can be assembled into VLPs by modifying pH and ionic strength. Taking together all our experimental data, we conclude that VLPs formation from denatured VP2 occurs efficiently upon removal of the denaturing GuHCl at pH 7.4, while at pH 4.0 the denatured protein forms mainly oligocapsomers. These species however are able to form VLPs if the pH is



**Fig. 6.** Schematic representation of B19-VP2 VLPs assembled from GuHCl-denatured VP2. pH during assembly is critical to obtain either VLPs or assembly intermediates. SDS promotes disassembly of both VLPs and oligocapsomeric species, primarily producing capsomers.

changed to 7.4. Finally, exposure of VLPs or oligocapsomers to small amounts of SDS produces species whose size suggest that are capsomers or monomers of VP2 (Fig. 6). Our results indicate that the best conditions for B19-VP2 VLPs assembly *in vitro* are PBS (pH 7.4, ionic strength 0.166 mol/L) at 4 °C.

In summary, B19-VP2 can self-assemble *in vitro* into natural, well-organized nanoparticles. The ability of VP2 to form VLPs, from unfolded protein by dialysis or from capsomers by changes of pH, makes this system a good candidate for encapsulation experiments of molecules for biotechnological applications. Thermal stability of these VLPs may hold promise for use in medicine, including vaccine development, *i.e.*, for storage and formulation. Additional research is required to fully develop B19-VP2 VLPs as tools in nanosciences.

## Acknowledgments

This work was funded by grants from Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF), México (PIFUTP08-104) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México (99857). IBJ received support from the Alexander von Humboldt Foundation, Germany. SPSR received a PhD fellowship from CONACyT. The authors acknowledge technical support of Laura Álvarez-Añorve, Cristina Castañeda-Patlán and Silvia Juárez-Chavero from UNAM. We are grateful to Marimar López and Raymond Dove from Rensselaer Polytechnic Institute for their valuable help in sedimentation velocity analysis and TEM analysis, respectively.

## Appendix. Supplementary material

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.biochi.2011.12.006.

## References

- [1] M.G. Mateu, Virus engineering: functionalization and stabilization, *Protein Eng. Des. Sel.* 24 (2011) 53–63.
- [2] N.F. Steinmetz, Viral nanoparticles as platforms for next-generation therapeutics and imaging devices, *Nanomedicine: NBM* 6 (2010) 634–641.
- [3] S.P. Sánchez-Rodríguez, L. Münch-Anguiano, I. Bustos-Jaimes, Advances in the development of virus-like particles as tools in medicine and nanoscience, *Curr. Chem. Biol.* 4 (2010) 231–243.
- [4] G. Destito, A. Schneeman, M. Manchester, Biomedical nanotechnology using virus-based nanoparticles, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 327 (2009) 95–122.
- [5] C. Ludwig, R. Wagner, Virus-like particles-universal molecular toolboxes, *Curr. Opin. Biotechnol.* 18 (2007) 537–545.
- [6] M. Everts, V. Saini, J.L. Leddon, R.J. Kok, M. Stoff-Khalili, M.A. Preuss, C.L. Millican, G. Perkins, J.M. Brown, H. Bagaria, D.E. Nikles, D.T. Johnson, V.P. Zharov, D.T. Curiel, Covalently linked Au nanoparticles to a viral vector: potential for combined photothermal and gene cancer therapy, *Nano Lett.* 6 (2006) 587–591.
- [7] W.F. Ochoa, A. Chatterji, T. Lin, J.E. Johnson, Generation and structural analysis of reactive empty particles derived from an icosahedral virus, *Chem. Biol.* 13 (2006) 771–778.
- [8] P.G. Holder, D.T. Finley, N. Stephanopoulos, R. Walton, D.S. Clark, M.B. Francis, Dramatic thermal stability of virus-polymer conjugates in hydrophobic solvents, *Langmuir* 26 (2010) 17383–17388.
- [9] R. Noad, P. Roy, Virus-like particles as immunogens, *Trends Microbiol.* 11 (2003) 438–444.
- [10] A. Carreira, M. Menéndez, J. Reguera, J.M. Almendral, M.G. Mateu, *In vitro* disassembly of a parvovirus capsid and effect on capsid stability of heterologous peptide insertions in surface loops, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 6517–6525.
- [11] E.M. Plummer, M. Manchester, Viral nanoparticles and virus-like particles: platforms for contemporary vaccine design, *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.* 3 (2011) 174–196.
- [12] L. Shi, H.L. Sings, J.T. Bryan, B. Wang, Y. Wang, H. Mach, M. Kosinski, M.W. Washabaugh, R. Sitrin, E. Barr, GARDASIL: prophylactic human papillomavirus vaccine development – from bench top to bed-side, *Clin. Pharmacol. Ther.* 81 (2007) 259–264.
- [13] K. Pattenden, P.J. Middelberg, M. Niebert, I.D. Lipin, Towards the preparative and large-scale precision manufacture of virus-like particles, *Trends Biotechnol.* 23 (2005) 523–529.
- [14] K.N. Parent, C.M. Teschke, GroEL/S substrate specificity based on substrate unfolding propensity, *Cell Stress Chaperones* 12 (2007) 20–32.
- [15] Y. Ding, Y.P. Chuan, L. He, A.P. Middelberg, Modeling the competition between aggregation and self-assembly during virus-like particle processing, *Biotechnol. Bioeng.* 107 (2010) 550–560.
- [16] M.C. Colomar, C. Degoumois-Sahli, P. Beard, Opening and refolding of simian virus 40 and *in vitro* packaging of foreign DNA, *J. Virol.* 67 (1993) 2779–2786.
- [17] M.P. McCarthy, W.I. White, F. Palmer-Hill, S. Koenig, J.A. Suzich, Quantitative disassembly and reassembly of human papillomavirus type 11 viruslike particles *in vitro*, *J. Virol.* 72 (1998) 32–41.
- [18] W.B. Lai, A.P.J. Middelberg, The production of human papillomavirus type 16 L1 vaccine product from *Escherichia coli* inclusion bodies, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 25 (2002) 121–128.
- [19] Y. Zhang, S. Song, C. Liu, Y. Wang, X. Xian, Y. He, J. Wang, F. Liu, S. Sun, Generation of chimeric Hbc proteins with epitopes in *E. coli*: formation of virus-like particles and a potent inducer of antigen-specific cytotoxic immune response and anti-tumor effect *in vivo*, *Cell Immunol.* 247 (2007) 18–27.
- [20] B.L. Gurda, K.N. Parent, H. Bladdek, R.S. Sinkovits, M.A. DiMattia, C. Rence, A. Castro, R. McKenna, N. Olson, K. Brown, T.S. Baker, M. Agbandje-McKenna, Human bocavirus capsid structure: insights into structural repertoire of *Parvoviridae*, *J. Virol.* 84 (2010) 5880–5889.
- [21] M.E. Bloom, N.S. Young, Parvoviruses, in: D.M. Knipe, P.M. Howley, D.E. Griffin (Eds.), *Fields Virology*, Vol. 70, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2008, pp. 2361–2379.
- [22] U. Desselberger, Emerging and re-emerging infectious diseases, *J. Infect.* 40 (2000) 3–15.
- [23] S.J. Naides, Infection with parvovirus B19, *Curr. Infect. Dis. Rep.* 1 (1999) 273–278.
- [24] L.J. Anderson, N.S. Young, Human parvovirus B19, in: W.P. Parks (Ed.), *Monographs in Virology*, Vol. 20, Karger, Basel, 1997.
- [25] B. Kaufmann, A.A. Simpson, M.G. Rossmann, The structure of human parvovirus B19, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 11628–11633.
- [26] C.S. Brown, J.W. Van Lent, J.M. Vlak, W.J. Spaan, Assembly of empty capsids by using baculovirus recombinants expressing human parvovirus B19 structural proteins, *J. Virol.* 65 (1991) 2702–2706.
- [27] G.P. Bansal, J.A. Hatfield, F.E. Dunn, A.A. Kramer, F. Brady, C.H. Riggan, M.S. Collett, K. Yoshimoto, S. Kajigaya, N.S. Young, Candidate recombinant vaccine for human B19 parvovirus, *J. Infect. Dis.* 167 (1993) 1034–1044.
- [28] T. Lowin, U. Raab, J. Schroeder, R. Franssila, S. Modrow, Parvovirus B19 VP2-proteins produced in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison with VP2-particles produced by baculovirus-derived vectors, *J. Vet. Med. B* 52 (2005) 348–352.
- [29] G. Amexis, N.S. Young, Parvovirus B19 empty capsids as antigen carriers for presentation of antigenic determinants of dengue 2 virus, *J. Infect. Dis.* 194 (2006) 790–794.
- [30] K.E. Brown, N.S. Young, M.L. Johnson, Molecular, cellular and clinical aspects of parvovirus B19 infection, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 16 (1994) 1–31.
- [31] M. Eshagi, W.S. Tan, W.K. Chin, K. Yusoff, Purification of the extra-cellular domain of Nipah virus glycoprotein produced in *Escherichia coli* and possible application in diagnosis, *J. Biotechnol.* 116 (2005) 221–226.
- [32] D. Das, F. Jacobs, H. Feldmann, S.M. Jones, M.R. Suresh, Differential expression of the Ebola virus GP<sub>1,2</sub> protein and its fragments in *E. coli*, *Protein Expr. Purif.* 54 (2007) 117–125.
- [33] M. Klikova, S.S. Rhee, E. Hunter, T. Ruml, Efficient *in vivo* and *in vitro* assembly of retroviral capsids from gag precursor proteins expressed in bacteria, *J. Virol.* 69 (1995) 1093–1098.
- [34] M.D. Abramoff, P.J. Magelhaes, S.J. Ram, Image processing with ImageJ, *Bioinformatics Int.* 11 (2004) 36–42.
- [35] A.H. Harvey, J.S. Gallagher, J.M.H. Levelt Sengers, Revised formulation for the refractive index of water and steam as a function of wavelength, temperature and density, *J. Phys. Chem. Ref. Data* 27 (1998) 761–774.
- [36] S. Yin, S. Sun, S. Yang, Y. Shang, X. Cai, X. Liu, Self-assembly of virus-like particles of porcine circovirus type 2 capsid protein expressed from *Escherichia coli*, *Virol. J.* 7 (2010) 166.
- [37] L. Lavelle, M. Gingery, M. Phillips, W.M. Gelbart, C.M. Knobler, Phase diagram of self-assembled viral capsid protein polymorphs, *J. Phys. Chem. B* 113 (2009) 3813–3819.
- [38] S.E. Delos, T.P. Cripe, A.D. Leavitt, H. Greisman, R.L. Garcea, Expression of the polyomavirus minor capsid proteins VP2 and VP3 in *Escherichia coli*: *in vitro* interactions with recombinant VP1 capsomeres, *J. Virol.* 69 (1995) 7734–7742.
- [39] X. Zhao, J.M. Fox, N.H. Olson, T.S. Baker, M.J. Young, *In vitro* assembly of cowpea chlorotic mottle virus from coat protein expressed in *Escherichia coli* and *in vitro*-transcribed viral cDNA, *Virology* 207 (1995) 486–494.
- [40] S. Kajigaya, T. Shimada, S. Fujita, N.S. Young, A genetically engineered cell line that produces empty capsids of B19 (human) parvovirus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 7601–7605.
- [41] L. Gilbert, J. Toivola, O. Väliheito, T. Saloniemi, C. Cunningham, D. White, A.R. Mäkelä, E. Korhonen, M. Vuento, C. Oker-Blom, Truncated forms of viral VP2 proteins fused to EGFP assemble into fluorescent parvovirus-like particles, *J. Nanobiotechnology* 4 (2006) 13.
- [42] P.O. Michel, A.R. Mäkelä, E. Korhonen, J. Toivola, L. Hedman, M. Söderlund-Venermo, K. Hedman, C. Oker-Blom, Purification and analysis of polyhistidine-tagged human parvovirus B19 VP1 and VP2 expressed in insect cells, *J. Virol. Methods* 152 (2008) 1–5.
- [43] Y.W. Yang, C.C. Teng, Conformational changes of polyomavirus major capsid protein VP<sub>1</sub> in sodium dodecyl sulfate solution, *J. Pept. Res.* 53 (1999) 75–81.

- [44] K.W. Lee, W.S. Tan, Recombinant hepatitis B virus core particles: association, dissociation and encapsidation of green fluorescent protein, *J. Virol. Methods* 151 (2008) 172–180.
- [45] H.D. Nguyen, V.S. Reddy, C.L. Brooks 3rd, Invariant polymorphism in virus capsid assembly, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 2606–2614.
- [46] S.N. Fejer, D. Chakrabarti, D.J. Wales, Emergent complexity from simple anisotropic building blocks: shells, tubes, and spirals, *ACS Nano* 4 (2010) 219–228.
- [47] W. Yuan, C.R. Parrish, Canine parvovirus capsid assembly and differences in mammalian and insect cells, *Virology* 279 (2001) 546–557.
- [48] B.N. Dominy, D. Perl, F.X. Schmid, C.L. Brooks 3rd, The effects of ionic strength on protein stability: the cold shock protein family, *J. Mol. Biol.* 319 (2002) 541–554.
- [49] S.E. Anigayei, C.J. Kennedy, B. Stein, D.A. Willits, T. Douglas, M.J. Young, M. De, V.M. Rotello, D. Srisathyanarayanan, C.C. Kao, B. Dragnea, Synergistic effects of mutations and nanoparticle templating in self-assembly of cowpea chlorotic mottle virus capsids, *Nano Lett.* 9 (2009) 393–398.
- [50] J. Sun, C. DuFort, M.C. Daniel, A. Murali, C. Chen, K. Gopinath, B. Stein, M. De, V.M. Rotello, A. Holzenburg, C. Kao, B. Dragnea, Core-controlled polymorphism in virus like particles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (2007) 1354–1359.
- [51] E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M.R. Wilkins, R.D. Appel, A. Bairoch, Protein identification and analysis tools on the ExPASy server, in: J.M. Walker (Ed.), *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press, Clifton, 2005, pp. 571–607.
- [52] B. Mani, M. Gerber, P. Lieby, N. Boschetti, C. Kempf, C. Ros, Molecular mechanism underlying B19 virus inactivation and comparison to other parvoviruses, *Transfusion* 47 (2007) 1765–1774.
- [53] C. Ros, C. Baltzer, B. Mani, C. Kempf, Parvovirus uncoating *in vitro* reveals a mechanism of DNA release without capsid disassembly and striking differences in encapsidated DNA stability, *Virology* 345 (2006) 137–147.



# Advances in the Development of Virus-Like Particles as Tools in Medicine and Nanoscience

Sandra Paola Sánchez-Rodríguez, Lucía Münch-Anguiano and Ismael Bustos-Jaimes\*

*Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México*

**Abstract:** Virus-like particles (VLPs) are viral coats formed by the self-assembly of the components of viruses excluding their genetic material. These particles may be used as vectors to transport molecules chemically attached on the VLP surface, or as vessels for the systemic delivery of pharmacologically important molecules as drugs, siRNAs, genes, mRNAs, magnetic nanoparticles, quantum dots and other medical-imaging aids. Herein we review the recent advances in heterologous production and purification of VLPs, the current trends in chemical modification of VLPs, and the advances on the application of VLPs as vectors, tools for medical imaging and materials for nanotechnology.

**Keywords:** Virus-like particles, nanomaterials, nanomedicine, drug delivery, gene delivery, imaging.

## 1. INTRODUCTION

Viruses are natural supramolecular complexes forming nanostructures in the range of 20 to 300 nm in size. More than 2400 of virus species are known, with extraordinarily diverse morphologies and biochemical compositions. In their native state, viruses are protein assemblies, which act as host containers for nucleic acid storage and transport. They have single- or double-stranded RNA or DNA genomes packaged into icosahedral or helical protein shells, called capsids, which are sometimes wrapped in a lipid envelope [1].

Viruses are obligate intracellular parasites which multiply by redirecting the host cell biosynthetic machinery from the production of cellular components to the manufacture of proteins and nucleic acids required for the viral assembly. Virus replicates itself by entering a host cell, disassembling itself and copying its components, which are then assembled into progeny virus particles, which can infect additional cells, leading to a characteristic pattern of tissue destruction [2].

The protein shell of viruses is usually constructed by small identical protein subunits, enabling the self-assembly of the capsid, a large superstructure, with a minimal use of the limited amount of genetic material available. The capsid is constructed through interactions of the identical protein subunits with each other using non-covalent interactions. The size of proteins found in virus structures depends on the role of the protein in the virus architecture.

The molecular nature of viruses has attracted the attention of scientists because of its potential for targeted drug delivery. Remember that viruses are the most effective means of nucleic-acid delivery, achieving efficiencies higher

than 90% for both delivery and expression [3]. To exploit the remarkable delivery efficiency of viruses and avoid its natural infective potential, scientists constructed the so-called "virus-like particles" (VLPs), which are structurally identical to native viruses, but they lack the viral genetic material and therefore are noninfectious [4]. VLPs may be obtained when the major viral structural proteins are simultaneously expressed in a recombinant system. There exists an increasing interest on VLPs production due to their promising applications as vaccines, delivery vehicles for substances or genes, or as biosensors [5]. A recent example of the importance of VLPs is the recent FDA approval of Merck's vaccine against human papilloma virus (Gardasil®).

Capsids or VLPs are composed of monomers of structural proteins arranged into organized sub-structures called capsomeres [6]. The self-assembly ability of capsomeres results in the formation of viral particles [7]. VLPs may be used as empty shells or can be loaded *ex vivo* with a payload typically comprising DNA, small molecules or proteins [8]. Because many viruses can be made in large quantities and manipulated at the genetic level, they afford a unique opportunity for chemists to expand the repertoire of natural starting materials for synthetic and catalytic applications [9].

A large variety of viruses and its VLPs have been used as templates for nanomaterial fabrication and to develop technological applications including biomaterials, vaccines, catalytic and chemical tools, imaging, and molecular electronic materials [4,10-13]. The enormous potential of VLPs in the field of nanotechnology relies on its structural features. Among the major structural advantages are their biocompatibility and size [14]. VLPs exhibit well-defined geometry and remarkable uniformity, ideal for nanoscale fabrication. Furthermore, VLPs present remarkably stability in a wide range of pH and temperature, as well as high tolerance to organic solvents [10]. On the medical field, VLPs can induce immune responses similar to their native virions but without the danger of infections, as they lack viral genetic material

\*Address correspondence to this author at the Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad Universitaria, Mexico City 04510, Mexico; Tel: +52-55-56232260; Fax: +52-55-56162419; E-mail: ismaelb@unam.mx

[15]. Finally, it is possible to produce and isolate VLPs in large quantities by means of simple methods, in particular when heterologous expression systems are used.

Virus capsids and its derivatives VLPs have two distinct surfaces (inside and outside) that can be exploited to generate nanomaterials displaying multiple functionalities by design, with potential nano- and biotechnological application [16]. VLPs surfaces have been functionalized with a large variety of molecules, including fluorescent dyes, vitamins, azides and alkynes, carbohydrates, nucleic acids, polyethylene glycol, peptides, proteins, conducting particles and luminescent quantum dots [17]. Chemical and genetic modifications of the surface of VLPs increase the possibilities for its decoration, conferring unique chemical properties that may be used for attachment and presentation of different moieties in its external surface [4,11]. In addition, the space in the interior of the protein coat may broaden its versatility as nanomaterial for encapsulating a wide variety of molecules, for example for gene- or drug-delivery purposes [18].

## 2. VLPs PRODUCTION AND PURIFICATION

The main bottlenecks for wide use of VLPs in medicine and other applications are its large-scale production and further purification. Viral structural proteins have been successfully expressed in a variety of heterologous expression systems, e.g. various mammalian cell lines, either transiently or stably transfected or transduced with viral expression vectors, the baculovirus/insect cell system, various species of yeast including *Sacharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*, and *Escherichia coli* and other bacteria as *Pseudomonas* [6, 19-23]. A few of these expression systems have resulted in the self-assembly of VLPs. The most widely used hosts for viral protein expression are yeast, *E. coli* and baculovirus. Each of these systems has its limitations and advantages. *E. coli*-based expression often results in the formation of insoluble inclusion aggregates and does not allow protein glycosylation, while yeast and baculovirus are limited to high-mannose glycoprotein modification. Due to ease of expression, ability to scale-up and cost of production, yeast- and bacteria-based systems are often used [24-26]. However baculovirus has been successfully applied as expression system for VLPs [20,21]. Baculovirus, as other expression systems, requires to be engineered to incorporate the desired genes by molecular genetics methods. Expression systems based on baculovirus are commercially available as large shuttle vectors able to replicate in *E. coli* (bacmids). After inclusion of heterologous genes in the bacmid, it is purified from *E. coli* and then used to transform permissive insect cells, leading to the generation of recombinant baculovirus particles that can be used to infect new insect cells and express the inserted genes. Recombinant genes can be those for the production of the capsids of a different virus, thus the insect cells infected with these virus will, in turn, produce the protein molecules required for the assembly of VLPs inside the infected insect cell. A detailed description of the procedure can be found in the work of Berger and coworkers [27].

Worth to mention is that VLPs can be produced in other expression systems, like transgenic plants [28] and no restrictions are foreseen for other expression systems. Selec-

tion of the expression system involves a large number of factors, and the final choice will rely on the particular circumstances of the VLP nature and its desired use. VLPs can be directly purified and used after *in vivo* self-assembly or can be subjected to *ex vivo* reassembly to improve efficiency, product homogeneity and, if desired, may be packed together with therapeutically active molecules [6]. Of course the purpose of VLPs determine how and when the VLPs must be assembled and if any molecule has to be present.

One of the most studied VLPs is that from cowpea chlorotic mottle virus (CCMV). The coat protein (CP) of CCMV has been expressed in the yeast *Pichia pastoris* and assembled into VLPs *in vivo* at a yield of 0.05–0.5 mg g<sup>-1</sup> of wet cell mass [29]. Production of soluble, fully assembled CCMV VLPs in prokaryotic expression systems has been so far unsuccessful. In contrast, expression of CCMV CP in *E. coli* results in the formation of insoluble inclusion aggregates [24,25,26]. Although VLPs can be assembled *in vitro* from refolded CPs [26], this process may be complex, inefficient, and not suitable for production of large amounts of VLPs. After lysis of the producing cells and separation of cell debris, different purification methods can be used to achieve pure recombinant proteins. Many different techniques can be used for the purification and characterization of VLPs; for example sucrose and CsCl gradients, size-exclusion chromatography, electron microscopy, dynamic light scattering, etc. Table 1 summarizes the different systems to produce VLPs from different virus as well as the methods used for purification.

The application of modern structural methods, mainly X-ray crystallography and electron microscopy, has revealed viruses as fascinating chemical assemblies. Viral complexity varies from one to another; for example the cowpea mosaic virus (CPMV) is a picorna-like plant virus that encapsulates two segments of single-stranded, positive sense RNA. The larger RNA1 encodes the virus replication machinery, and the smaller RNA2 encodes the capsid proteins and the viral movement protein. Both RNA molecules are separately encapsidated in isometric particles, and both types of particles are required for the infection [18]. Another good model to provide high yields of VLPs *in vitro* is the brome mosaic virus (BMV). It is a small icosahedral virus (28 nm) that is composed of 180 identical proteins of 20 kDa that form pentameric and hexameric subunits. The BMV VLP is compact at low to moderate ionic strength buffers with pH below 5.0, but experiences a structural transition when the pH is increased to 7. This transition is a reversible expansion that occurs without dissociation [30].

Large-scale virus production can be achieved through the manipulation of the culture process according to the bioreactor type and the selected heterologous expression system [31]. In addition, the final application and the nature of VLP assembly process may be taken into account because it will determine the downstream purification process. For direct use of VLPs in therapy, the self-assembly systems, as baculovirus and insect cells, may be preferred over those requiring refolding of inclusion bodies. However, for inclusion of drugs, nucleic acids or imaging aids into the core of VLPs, the ease of use of bacterial and yeast-based expression systems may be favoured as the unfolding of inclusion bodies

Table 1. Expression and Purification Systems for Virus-like Particles

Virus	Expression System	Purification	Yields	Reference
Cowpea Chlorotic Mottle Bromovirus (CCMV)	<i>Pichia pastoris</i>	CsCl gradients	0.05 a 0.5 mg (g wet cell mass) <sup>-1</sup>	[29]
CCMV	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	PEG precipitation and sucrose gradient	2.6 mg/ mL	[82]
CCMV	<i>Escherichia coli</i>	Inclusion body solubilization in 8 M urea, refolding and gel filtration	10 mg/L of induced culture, 50-80% pure	[24]
Chimeric Cowpea Mosaic Virus (CPMV) with peptide antigens from <i>Bacillus anthracis</i>	Cowpea Plants <i>Vigna unguiculata</i>	Differential centrifugation and anion exchange chromatography	0.3 g/ kg of leaf tissue	[83]
Bacteriophage GA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CL4B gel filtration	0.6 to 2.0 mg/g of cells	[84]
Bacteriophage GA	<i>Pichia pastoris</i>	CL4B gel filtration	Up to 3 mg/g of cells	[84]
Human Papillomavirus (HPV)	Baculovirus in Sf9 insect cells	Sucrose and CsCl gradients	1.5-2-8 mg/ 10 <sup>6</sup> cells	[85]
HPV	Baculovirus in Sf9 insect cells	Sucrose and CsCl gradients	-----	[79]
HPV 11 and HPV 16	<i>Escherichia coli</i>	Glutathione affinity column Chitin chromatography and gel filtration	-----	[86]
Canine Parvovirus (CPV)	Baculovirus in Sf9 insect cells	Sucrose gradient	0.5-2.5 mg/L of infected cells	[87]
Parvovirus B19 VP2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sucrose gradient	0.4 mg/ mL of yeast lysate	[88]
Parvovirus B19 VP1 and VP2 (polyhistidine-tagged)	Baculovirus in Sf9 insect cells	Immobilized metal-ion affinity chromatography (IMAC)	30-35 mg of protein purified/300 mL of culture	[89]
Porcine Parvovirus (PPV)	Baculovirus in Sf9 insect cells	Precipitation Diafiltration	-----	[90]
Simian rotavirus (SRV) VP2/VP6	Baculovirus in larvae of <i>Spodoptera frugiperda</i>	CsCl gradients	0.4 µg/single larvae cell	[91]
SRV VP2/VP6	Baculovirus in Sf9 insect cells	CsCl gradients	2,492 µg of protein/ 6x10 <sup>8</sup> infected cells	[92]
Chimeric Rotavirus VP2-bovine RF/VP6 simian SA11	Baculovirus in Sf9 insect cells	CsCl gradients	153 µg of protein/ 6x10 <sup>8</sup> infected cells	[92]
Simian Virus 40 (SV40) P1	Baculovirus in Sf9 insect cells	CsCl gradient	-----	[93]
RNA phages MS2	<i>Escherichia coli</i>	CL4B gel filtration	-----	[94]

Table 1. Contd....

Virus	Expression System	Purification	Yields	Reference
Bacteriophage MS2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PEG precipitation and CsCl gradients	2x10 <sup>15</sup> particles/L of culture	[95]
SARS coronavirus With S,E, M, N structural proteins	Baculovirus in Sf9 insect cells	Sucrose gradient	200 µg/ 10 <sup>9</sup> cells	[96]
Human immunodeficiency virus (HIV-1)/ hepatitis B virus (HBV)	<i>Nicotiana tabacum</i> and <i>Arabidopsis thaliana</i>	-----	2-26 ng HBsAg/g Tobacco FW 3-15 ng HBsAg/g Arabidopsis FW	[97]
HIV-1 pr55 <sup>gag</sup>	Baculovirus in Sf9 insect cells	Sucrose gradient	-----	[98]
Potato Virus X (PVX)/ Cucumber Mosaic Virus (CMV)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	Differential centrifugation and sucrose gradient	0.3 to 1.8 mg/mL of protein depending on the amount of fresh tissue (20-200 g of infected leaves)	[99]
SV40-VP1	<i>Escherichia coli</i>	Ni-nitrilotriacetate-agarose resin	-----	[100]

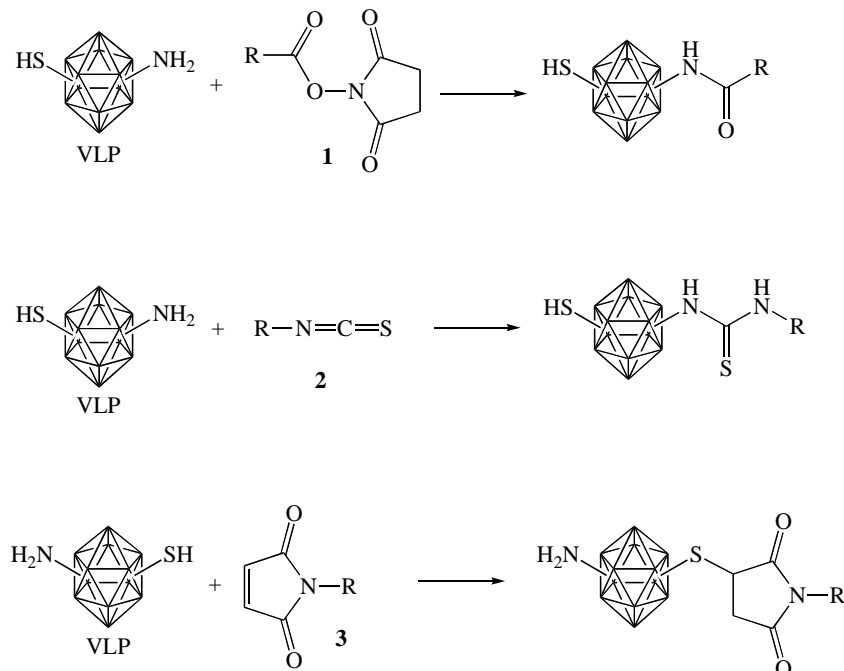
will take place anyway prior to the encapsulation process. In any scenario, the purity of VLPs is critical for clinical trials and final applications.

Typical methods for VLPs purification are based in ultracentrifugation-produced gradients either of sucrose or CsCl. At the laboratory scale, ultracentrifugation-based purification protocols provide the required purity. Unfortunately this technique does not scale-up well. In contrast, chromatographic methods can be scaled-up with ease. Usually a combination of chromatographic methods is applied to achieve the required purity [32]. The different methods can be combined according to the specific properties of the viral particles to be purified. It has been found that a combination of microfiltration and ultrafiltration are useful for clarification and concentration of viral particles. Further purification can be achieved by ion exchange chromatography and, if required, a final polishing step of size exclusion chromatography. A vector derived from the murine leukemia virus was purified following this process. Although the overall yield was 26%, the purity of virus particles was higher than 99% [33]. In other example, adenoviral vectors were purified by a combination of packed bed and expanded bed ion exchange chromatography. The latter methodology enables proteins to be recovered directly from cells or disrupted cells, without the need for prior removal of suspended solids, reducing thus the sample handling. Samples were finally concentrated in a hollow fiber cartridge. The final purity was equivalent to that obtained by CsCl gradient, which is useful for clinical use, while the yield was 32%, which is 8-fold higher than the yield obtained with other methodologies [34].

### 3. SURFACE MODIFICATION OF VLPs

The ability to chemically modify the surfaces of VLPs makes it possible to confer properties that make them potentially useful in biotechnology, nanotechnology and electronic applications [35]. In the last years VLPs have gained ground in the field of nanobiotechnology as organic templates for

development of new biomaterials [36]. The surface of the virus has been used as a scaffold for the selective attachment of different small molecules. This can be achieved by either genetically modifying the viral genes or by chemically attaching of peptides to different reactive groups on the virus particles [10,14]. The surface of VLPs may be modified such that contact points or chemically modifiable amino acids can be inserted in specific locations on the protein shell surface. For example *N*-hydroxysuccinimide (NHS) esters can be conjugated to the lysine residues, while maleimide, which is a thiol-selective reagent, can react and form bonds with cysteine residues [11]. One of the best-studied and better-characterized viruses is the CPMV. Wang and coworkers [37] reported the specific modification of wild-type CPMV by lysine-selective derivatives of fluorescein, NHS-esters, isothiocyanate and biotin (Fig. 1). They found that CPMV possess a lysine residue with enhanced reactivity in each asymmetric unit, giving a total of 60 modified residues per virus particle, which are displayed on the periphery of the structure. CPMV particles have been decorated with ferrocenes using the exterior amino groups for selective attachment [17]. Several groups have genetically engineered CPMV to produce particles with precise properties. In its natural state, CPMV does not display cysteine residues on the capsid surface. Blum and coworkers [38] have genetically engineered CPMV to present cysteine residues at selected positions, which were used to anchor gold nanoparticles that were subsequently connected by molecules able to conduct electricity. The result was a viral particle surrounded by a network of molecules, crossing the virus surface, whose conductance was measured. Wang and coworkers [39] developed CPMV mutants with cysteine residues in one of the exterior positions of the asymmetric unit. These residues were highly reactive to thiol-selective reagents as 2-bromoacetamides and maleimides. The group of Wang also demonstrated that nanogold particles could decorate the CPMV surface at those specifically engineered cysteine residues. This may lead to the development of interesting elec-

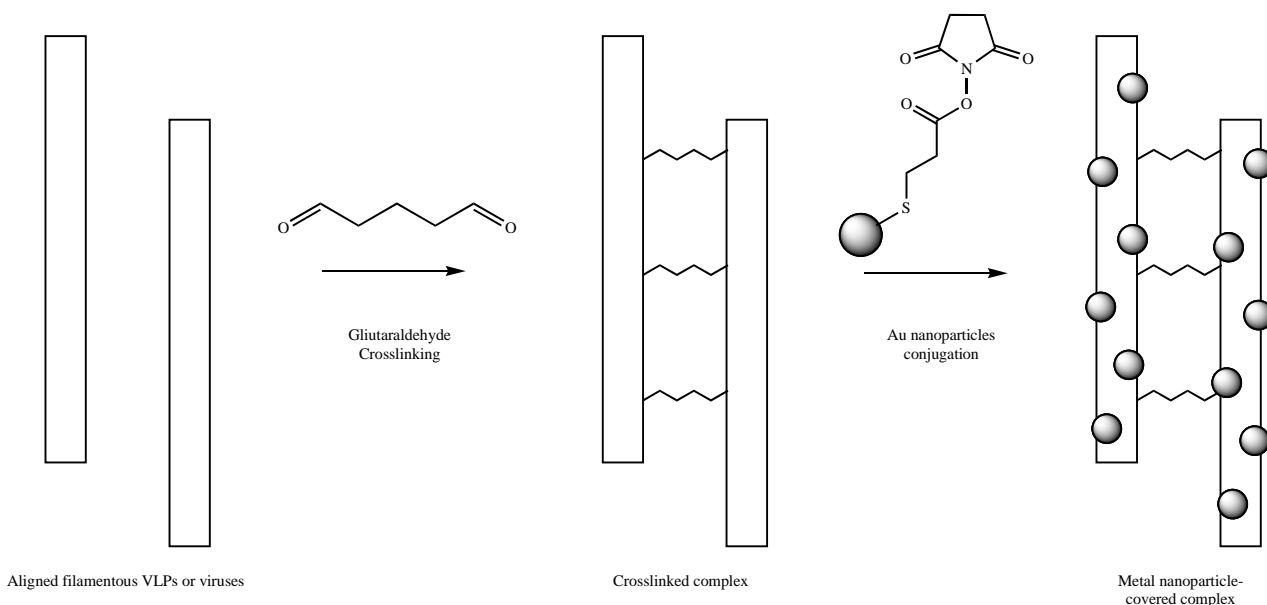


**Fig. (1).** Chemical modification of Lys and Cys residues on VLPs surfaces. **1.** NHS-esters; **2.** thiocyanate derivate; **3.** maleimide derivative. Modified from reference [37].

trontransfer mediators in redox catalysis, molecular recognition, amperometric biosensors, and nanoelectronic devices such as molecular batteries [17]. Such approach is useful for CPMV and might be useful for other VLPs, viruses and proteins. Of course the same reactions can be applied to conjugate molecules that will target VLPs to specific cell types or tissues. For example, a NHS-ester derivative of folic acid was used to conjugate this compound to Lys residues on the surface of CPMV. This modification of the viral particles resulted in the ability of the virus to enter into KB tumor cells [40]. This is critical as all tumor cells cannot synthesize folic acid and must uptake it from the media. Other specific VLP-decorations for cell targeting have been reviewed by Manchester and Singh [10].

Decoration of VLPs has potential applications in optical, electronic, and mechanical devices for the creation of sensors, and catalysts. Using bioorganic materials as templates to build up anisotropic inorganic nanostructures has emerged as a highly attractive method in recent years, because most inorganic materials do not form the desired structure by themselves [41]. Organized biomolecular architectures, as VLPs, offer a variety of morphologies which are robust enough to tolerate chemical modifications and therefore produce novel organic/inorganic materials [42]. Rod shaped virus, like tobacco mosaic virus (TMV), M13 bacteriophage and *fd* virus, have opened the door to new organic-inorganic materials with especial structures and properties, containing metals, silica and semiconductor particles. These structures allow for the combined chemical functionality of the modifying agent and the virus protein coat advantages, *e.g.* low size polydispersity and liquid-crystalline organization. A clear example is the filamentous *fd* virus, which has been used as a template for the formation of silica nanomaterials with

well-defined morphologies [41]. The M13 virus, almost identical to *fd*, has been intensively explored as a template in the synthesis of metallic and other magnetic and semiconducting nanowires for various applications including detection, catalysis, energy storage and power generation [43,44]. The strategy used was to specifically modify the coat protein of M13 via genetic engineering, although it is possible to modify the residues that are chemically accessible to a variety of reagents [45,46]. The genome of M13 phage, as other viruses, can be rationally engineered to produce viral particles with distinct substrate-specific peptides expressed on the filamentous capsid, providing a genetic template for programmable assembly of complex nanostructures [43,44]. The group of Belcher [45,46] inserted short-peptide domains on the M13 external surface, displaying affinity to zinc sulfide, cadmium sulfide, iron-platinum or cobalt-platinum. The subsequent annealing of the mineralized particles at high temperatures, but below the melting point of the added minerals, produced crystalline nanowires through the removal of the organic template. Another virus that has been used for the preparation of nanomaterials is TMV. Velez and coworkers [47] created a procedure for the selective metallization of TMV fibers into wires (Fig. 2). This allowed the formation of large uniform coatings with highly anisotropic conductivity that can find applications in nanoelectronic devices such as molecular batteries [11,14,48]. Nam and coworkers [12] followed a similar approach, using the M13 virus to synthesize and assemble nanowires of cobalt oxide ( $\text{Co}_3\text{O}_4$ ). For this purpose a tetraglutamate peptide was fused to the N-terminus of each copy of the major coat p8 protein of the virus. This motif can serve as a general template for growing nanowires through the interaction of the glutamate with different metallic ions. Those nanowires were successfully used to construct battery electrodes.



**Fig. (2).** Schematic representation of the process to form nanowires from filamentous VLPs or viruses. First the VLPs or viral capsids must be cross-linked with glutaraldehyde. Further addition of metal particles, denoted here as grey spheres, on the surface of the protein shell forms a net of conductive particles.

#### 4. VLPs IN MOLECULAR IMAGING

The most compelling advantage of viral-based platforms for imaging is that VLPs can be functionalized due to the multivalency of chemically addressable sites on the surface of the protein shell [49]. In addition, the constraints of self-assembly ensure a low morphological polydispersity within the population of particles that can be difficult to achieve using synthetic methods. Together, these properties make possible the development of biocompatible nanoparticles that have both specificity and high sensitivity, which are required for non-invasive imaging in particular tissues.

An important goal for the development of sensitive imaging sensors is the possibility to specifically target cells and tissues of interest. The ability to detect and follow disease processes through non-invasive imaging techniques holds great promises for the early detection and treatment of human diseases. At the moment, the identification of specific ligands to target tissues of interest opens the door for the development of new materials that can specifically localize and image molecular events in the body in real time. Materials that combine the multiple functions of targeting, imaging, and drug delivery, have tremendous potential to increase the sensitivity and specificity of medical therapies. These materials will facilitate early detection and reduce adverse side effects of treatment. VLPs are among the most important materials intended as platforms for the development of tissue-specific targeting and imaging agents *in vivo* [10]. Table 2 shows a summary of different VLPs specifically produced for biomedical purposes like imaging and drug delivery.

Recently, VLPs have received attention as natural delivery vehicles for vaccines and therapeutics. Nonetheless it is important to study their biological properties and to elucidate the mechanism of infection and pathogenesis into the tissues and cells before its technological applications. Labeled VLPs

can unveil how these particles behave *in vivo*. Several studies have focused in studying the bioavailability, biocompatibility and toxicity of CPMV particles. Rae and coworkers [50] used fluorescence to determine the pattern of localization of CPMV particles in mouse tissues following oral or intravenous dosing. They used the reactive lysine residues to conjugate the NHS-ester of the Oregon Green 488 fluorophore onto CPMV particle. These studies helped to elucidate the distribution of CPMV in the tissues and showed that it may be delivered orally, transported across the intestinal epithelia of mice, and translocated to a variety of tissues *in vivo*. In a recent study [49], CPMV particles were labeled with the fluorophores Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 488 and fluorescein to study their ability to image the vascular system in live animals. The authors showed that dye-labeled CPMV reagents are superior to similar-sized fluorescent nanospheres for the resolution of microvasculature during intravital imaging. In the chick embryo, fluorescent CPMV particles differentially label the arterial and venous systems as a result of internalization of the particles by endothelial cells, allowing for rapid identification of vascular origin and the particles can remain localized within endothelial cells for at least 72 h. As CPMV particles remain in endothelial cells for extended periods, they can be used for mapping vascular endothelium and for quantification of endothelial cells during long-intravital imaging. Thus, a suitable method to quantify the bioavailability, half-life, and tissue accessibility of viral particles may be a pharmacokinetic study using labeled VLPs.

Few works have developed VLPs derived from human pathogenic viruses as imaging tools, though it has been possible to produce viral chimeras that carry the green fluorescent protein as model fluorophore. Recently, the enhanced green fluorescent protein (EGFP) was inserted at the N-terminus of the structural protein VP2 of the Human Parvo



Table 2. Examples of VLPs Produced for Bio-Medical Imaging and Drug Delivery

VLPs	Packaging or Labeling Molecule for Delivery	Encapsulating or Labeling Strategy	Cell Line for Delivery Studies	Reference
RNA bacteriophage MS2	Oligodeoxynucleotides (ODNs) encapsulating and covalent decoration with transferrin	The ODNs were synthesized as covalent extensions to the translational repressor/assembly initiation signal (TR), a 19 nt, stem-loop, of the RNA phage MS2	Myelogenous leukemia cells (RAW264)	[101]
Human Papillomavirus (HPV) 16L1/L2	Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester CFDA-SE	Purified HPV-16L1/L2 VLPs were labeled with CFDA-SE	COS7 monkey cells	[102]
HPV L1/L2	Green fluorescent protein pEGFP-N <sub>1</sub>	GFP DNA complexes with L1 VLPs, L1/L2 VLPs or L1/L2 N VLPs	HEK 293T cells	[79]
Human Polyomavirus JC (JCV) VP1	pCMV-β-Gal plasmid 4.5 kb	Dissociation for Ca <sup>2+</sup> removal and reduction of disulfide bonds, DNA encapsulation and refolded VLPs by Ca <sup>2+</sup> addition.	SVG, B, T and COS7 monkey kidney cells	[103]
Canine Parvovirus (CPV) VP2 and -N terminal deletion mutants of VP2 fused to the C-terminus of the enhanced green fluorescent protein (EGFP)	Green fluorescent protein EGFP	EGFP-fusion plasmid constructs for assembled EGFP-VP2 VLP EGFP-VP2-23 VLP EGFP-VP2-40 VLP	Sf9 cells infected with recombinant baculovirus	[104]
CPV VP2	Labelling of VLPs with Oregon green 488 succinimidyl ester (OG-488)	The Lysines of VLPs were derivatized with OG-488	Human tumor cell lines, HT-29, HeLa and MDA-MB231	[87]
Porcine Parvovirus (PPV) VP2 fused to chicken egg ovalbumin (OVA)	Labelling of VLPs with Alexa fluor 488 succinimidyl ester (AF)	The VP2 gene was expressed with the 257-264 peptide plus natural flanking sequences from chicken egg ovalbumin (OVA <sub>257-264</sub> ) and PPV-VLPs-OVA were labeled with AF	C57BL/6 mice were intravenously injected with PPV-VLPs-OVA	[105]
Hepatitis B Virus (HBV) HBcAg	Green Fluorescent Protein GFP	Encapsulating by dissociation of HBcAg VLPs with 2.5 M urea/25°C/3h and association by dialysis.	-----	[106]
Hepatitis E Virus (HEV) HBcAg	PjW4303 for expression of HIV env gp120 of the NL432 strain. pUC118: 3.162 kb pJW322: 5.93 kb pJWSIVenv: 8.63 kb pABWN: 11.2 kb	Dissociation for Ca <sup>2+</sup> removal, DNA encapsulation and refolded VLPs by Ca <sup>2+</sup> addition.	Mice for oral administration of VLPs loaded with HIV env cDNA. NIH/3T3 (mouse) RK13 (rabbit) COS-7 (monkey) HepG2 (human)	[66]

Table 2. Contd....

VLPs	Packaging or Labeling Molecule for Delivery	Encapsulating or Labeling Strategy	Cell Line for Delivery Studies	Reference
Murine Pneumotropic Virus (MPtV) VP1	Labelling of VLPs with Alexa fluor 488 succinimidyl ester (AF)	Purified MPtV-VLPs were labeled with AF	MAE (mouse) B16 (mouse) RMA (mouse) DC (mouse) HEF (human) RCC (human) SK-N-AS (human) RD (human) HeLa (human) 293 (human) DC (human) COS-1 (monkey) GMK (monkey)	[107]
Moloney Murine Leukemia Virus (MoMLV)	HLA class II/allergen-peptide complexes	HLA class II molecules was organized as $\alpha\beta$ -heterodimers on VLPs by their cotransfection with MoMLV gag/pol-induced VLPs	Art v 1 TCR transgenic (tg) Jurkat T cells expressing an IL2 enhancer/promoter driving luciferase.	[108]
Simian Virus 40 (SV40) VP2/3	Encapsulating heterologous protein EGFP and yeast cytosine deaminase (yCD)	Incorporation of EGFP and yCD into the VLPs via C-terminal fusion	Semi-confluent CV-1 cells	[80]
Cowpea Mosaic Virus (CPMV)	Labelling of VLPs with Alexa fluor 555 carboxylic acid, Alexa fluor 488 NHS and fluorescein (FITC)-NHS	Purified VLPs were derivatized with the different dyes	HT-1080 human tumor onplated on the chick choriallantoic membrane. Mouse embryos were injected intravenously with CPMV-A555	[49]

virus B19 without affecting the capsid assembly. The EGFP was displayed on the surface of these recombinant VLPs without noticeable structural modifications. These labeled VLPs were able to efficiently bind and enter into non-permissive cancer cells and traffic in connection with its microtubulus network [51]. These novel-imaging tools can be used as therapeutic agents for the development of fast and simple fluorescent-based diagnostic assays and to characterize the early phases of viral infections and thus allow the study virus tropism and other characteristics of virus-produced diseases. Other study [52] making use of VLPs derived from human pathogenic viruses showed that Polyomavirus-derived VLPs carrying EGFP fused with the C-terminal part of the VP3 minor protein can enter efficiently into mouse epithelial cells and fibroblasts, as well as human and mouse dendritic cells. Authors also demonstrated that VLPs are degraded either by lysosomes or proteasomes.

Virus tracking in living cells requires labeling the external and/or internal constituents of viruses with fluorophores, allowing thus the imaging by fluorescence microscopy [53]. As in any other fluorescence method, good photostability of

the labeling fluorophores is desirable and, in this context, quantum dots (QDs), have attracted great interest in many areas of research [54]. Successful examples of tagging viruses with QDs include the encapsulation of QDs in viral capsids [55], covalent linkage of QDs to viral capsids [56] and labeling of membrane-enveloped viruses with QDs [53]. In the last case, the strategy consisted in the incorporation of a 15-amino acid biotin acceptor peptide (AP) tag on the surface of virion, which was then modified with biotin ligase (BirA) to specifically modify the AP-tag to introduce the biotin moiety on the viral surface. Further addition of streptavidin-conjugated QDs allowed the site-specific labeling of viral particles with QDs, which exhibited much better photostability than organic dyes. This labeling method resulted into an excellent tool to study the molecular mechanism of viral entry by direct visualization of the interactions between viruses and target cells.

## 5. VLPs AS MOLECULAR DELIVERY TOOLS AND VACCINES

Viral coats were selected by evolution for many functions, including the efficient entry of viruses through the

plasma membrane into cells and the delivery of genetic information into the cell nucleus or other cell compartments for virus gene expression. Viruses thus represent natural, highly specialized, transfer vectors for genetic material [1,52]. Viral genomes are naturally enclosed in protein shells, which very often have basic polypeptide domains oriented toward the particle interior. These basic domains create stable and specific ionic interactions with the nucleic acids of viruses. In the same way, small molecules with appropriate charge can also be incorporated within VLPs [57]. VLPs of different virus have been used as model systems for studying the encapsulation of molecules as polymers, proteins, plasmids and magnetic nanoparticles. As a result of the assembly of a regular protein coat around nanoparticle templates, new hybrid materials can be produced. These materials have potential applications in medical imaging and in bioanalytical sensing [58]. High reassembly yields are important for sufficient packaging and good yield of the end item. Therefore many studies have been focused in defining the factors that could have some effect during the encapsulation. The packaging of foreign molecules into VLPs can alter their size and morphology due to the change of interactions between structural proteins. For these reasons it is important to analyze the fundamental physical characteristics of VLPs following the packaging of foreign molecules [15]. It has been observed that the pore size in assembled capsid shells may change with pH. This reversible structural change, which opens or closes gated pores, allows switchable access to the capsid interior [59]. This structural change or “swelling transition”, making reference to the structural transitions induced by defined chemical switches, has been useful for the encapsulation of diverse molecules in virus coats. This structural transition allows the virus particle to selectively entrap and release materials from within the central cavity by a mechanism analogous to reversible gating. A typical example is the CCMV, which undergoes a reversible pH-dependent swelling, which results in a 10% increase in virus dimension. CCMV virions can be disassembled *in vitro*, into protein dimers and RNA, when pH changes. After removal of RNA, and with a new change in pH, the purified viral coat proteins will easily self-organize and form capsids again. This reversible assembly and disassembly mechanism provides a unique molecular method for controlling the inclusion and release of materials into CCMV capsids [60]. The basis for the nucleic acid encapsulation may rely on tight association between subunits of the capsid and nonspecific ionic interactions between the positively charged internal surfaces of the capsid and the nucleic acid [55]. Therefore, during the encapsulation of foreign materials is important to mimic the electrostatic behavior of the nucleic acid components of the native virus. The structural transition of CCMV with pH has been used for the mineralization of paratungstate and decavanadate inside the empty capsid [59]. Another example of a virus capsid displaying this dynamic structural transition is that of BMV. The 28 nm diameter BMV capsid is very stable at pH lower than 5.0, but undergoes a noticeable structural transition when pH is increased to 7. This reversible expansion occurs without dissociation when  $Mg^{2+}$  is present. This ion helps stabilizing the capsid at neutral pH [58].

In addition to swelling, it is possible to incorporate molecules or particles inside capsids by its disassembling and its further assembly in presence of the component to be encapsulated. The group of Dagnea used a self-assembly protocol to incorporate citrate-covered gold nanoparticles, with diameters ranging between 3 and 12 nm, inside capsids of BMV [61]. The nanoparticle-capsid complex assembly process was driven primarily by electrostatic interactions between the negatively charged gold nanoparticles and the positively charged internal compartment of the BMV capsids. They also studied the formation of VLPs of BMV on negatively charged gold nanoparticles functionalized with carboxylate terminated thiolalkylated tetraethylene glycol (TEG), which satisfies both the negative charge and the stability conditions required for self-assembly. In contrast to the encapsulation of Au nanoparticles functionalized with citrate or streptavidin, where the yield of incorporation remained below 2 - 3 %, the TEG-functionalized particles were incorporated up to 95% [58,62]. In addition the encapsulation yield can depend on the size and concentration of the gold nanoparticles. Smaller concentrations to the stoichiometric amount bring a low incorporation. However, higher ratios of nanoparticles to protein resulted in irreversible aggregation of the nanoparticles. Another limitation could be hydrophobic interactions between protein and the metal core, affecting the structure of the required precursor for rapid growth. These observations suggest a nucleation role for the negatively charged particle in the assembly of the protein coat.

In some other studies it has been explored the encapsulation of magnetic nanoparticles for biomedical applications such as contrast enhancement agents for resonance imaging or bioprobes. In its natural form, magnetic nanoparticles would require proper functionalization for biocompatibility. In contrast, the same nanoparticles encapsulated in VLPs can be used in biological systems without loss of their physical properties [13].

Unfortunately not every virus capsid can efficiently assemble in absence of its genetic material. For example the CPMV, as mentioned above, requires the interaction between protein and nucleic acids for capsid assembly. As a consequence, the internal surface of CPMV capsid has not been exploited extensively. However some strategies have been developed to remove the virus nucleic acid without degradation of its proteins. Ochoa and coworkers [18] developed a chemical method to generate empty capsids with good yield through gradual hydrolysis of the viral nucleic acid under alkaline conditions. The authors demonstrated the availability of internal cysteine residues, which are generally inaccessible in the presence of the viral genome for chemical reactions with cysteine-specific reporter fluorescent dyes, making them useful for nanotechnological applications.

Once the access to the interior of VLPs is available, they can be used for drug delivery in permissive cells. VLPs are excellent systems for *in vitro* drug delivery. Although *in vivo* applications of VLPs are not currently wide spread, several studies aiming to make their application possible are already in process [63]. Unfortunately many viruses infect more than one cell type. Consequently, genetically modified capsid proteins have been produced to narrow the host specificity of viral vectors [57,64]. For the same purpose it is possible to

produce viral chimeras that carry proteins from different viral origins [4]. Of course, chimeric virus technology can also be used to modify the surface of VLPs and allow the presentation of foreign peptides or molecules on the particle surface [65]. These chimeric proteins make possible to recruit desirable features from various viruses in a single particle, generating thus very narrow specificity and high efficiency of drug delivery.

VLPs also offer new approaches for vaccine development. Genetically modified VLPs have been used as immunogens with the principal aim of elicit immune responses and develop new vaccines [66]. Previous research clearly demonstrated that VLPs are able to induce B-cell-mediated immune responses and efficiently stimulate CD4 T cell proliferation and cytotoxic T lymphocyte responses [67]. VLP-derived vaccines from a large variety of viruses have been generated; these particles have demonstrated great potential for the prevention of infectious diseases. Currently, these particles have been validated in pre-clinical and clinical testing as vaccine candidates, and offer significant advantages over the existing vaccines. Some of these VLP-derived vaccines have demonstrated its clinical value and reached the clinical field as Gardasil<sup>®</sup> and Cervarix<sup>®</sup> against HPV [68], Recombivax<sup>®</sup> against Hepatitis B virus [69] and AMA1-C1/Alhydrogel<sup>®</sup> against malaria [70]. The use of VLPs for vaccine development is versatile and guarantees that antigens are more likely to be correctly folded, so the immune system will recognize them accurately. In the recent flu outbreak it was clear that a significant percentage of the vaccine development was performed on the field of VLPs. Vaccines were constructed by the production of influenza VLPs containing influenza hemagglutinin and neuraminidase in short times, allowing a immediate response for outbreaks [28,71,72].

Effective vaccines require the induction of specific immune responses with minimal side effects [7]. VLPs may also be ineffective although they conserve most of the native viral structure. Thus, some VLP-derived vaccine candidates may require adaptations in properties like particle size or envelope structure to achieve the desired immune response [19]. In order to improve its performance, VLPs may be modified to non-respond to the human immune system by introducing amino acid substitutions if such mutations are known as shown for the hepatitis B virus (HBV) [73].

As described before, peptides could be displayed on the particles surface for many purposes. Among the multiple goals for VLP decoration is the presentation of antigenic epitopes of non-related infectious agents. For example, CPMV chimeras expressing epitopes from gp1 of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) or VP2 of mink enteritis virus (MEV) were shown to generate neutralizing and protective antibodies, respectively, when injected into experimental animals [74,75]. CPMV chimeras have also been used to create an antiviral against measles virus (MV) by displaying a peptide known to inhibit MV infection. MV binds with high affinity to two peptides of its receptor, CD46. Engineering of one of the peptide sequences on the CPMV surface produced a chimera that inhibits the MV infection effectively by competence with the cell surface virus binding [76]. The same has been observed when core particles of HBV are used for epitope presentation [77]. Other

interesting model is the simian virus 40 (SV40), whose VLPs can be an efficient gene delivery vehicle that infect a broad range of cells and tissues. Takahashi and coworkers [63] identified two sites within the surface loops of SV40 Vp1 that can display foreign peptides without interfering with the assembly of VLPs.

Besides to work as vaccines, VLPs may serve as potentially attractive vectors for gene therapy and DNA-vaccination, providing convenient means for effective treatment or prevention of various human diseases, including cancer, infectious diseases and immunological disorders. Some studies have been focused in the encapsulation of unrelated constructs plasmids inside of different VLPs and confirming the liberation of unrelated plasmid in specific cellular lines [66,73]. It is required that the structures of VLPs provide resistance to its content against severe environments, like the digestive tracts and mucosal surfaces. The success of this requirement will rely on the correct selection of the VLP. It has been demonstrated the plasmid constructs can be encapsulated into VLPs of hepatitis E virus (HEV-VLPs) and delivered to the intestinal mucosa *in vivo* by oral administration. The delivery of plasmid DNA was confirmed by immunohistochemical analyses using an expression plasmid encoding human immunodeficiency virus epitope env (HIV env). HIV DNA vaccine loaded in HEV-VLPs induced both humoral and cellular immunity after oral administration. Moreover, HEV-VLPs can also be used as a vector for human gene therapy [66].

One of the milestones of VLP-technology has been the development of prophylactic vaccines for cervical disease associated to human papilloma virus (HPV), infection that may lead to cancer [78]. Rose and collaborators [79] demonstrated that VLPs of HPV are potentially useful for facilitating delivery and expression of plasmid DNA to antigen presenting cells, while the group of Oh [78] reported that the encapsulation of interleukin 2-expressing plasmid in HPV-VLPs could significantly enhance the induction of mucosal and systemic immune responses to HPV-VLP vaccines.

Instead of loading VLPs with nucleic acids, other groups have encapsulated proteins like the enhanced green fluorescent protein (EGFP) and the prodrug-modifying enzyme cytosine deaminase from yeast (yCD) into SV40 VLPs. These engineered VLPs retained the ability to bind, enter and delivery its content to cells. In addition, VLPs also stabilized the encapsulated enzymes [80]. The group of Yamada [73,81] established and *ex vivo* and *in vivo* system for gene and drug delivery using VLPs derived from HBV. Plasmids or small molecules can be introduced into the nanoparticles by electroporation, and these particles can be specifically targeted to hepatocytes.

## CONCLUSIONS

The protein nature of VLPs provides many advantages for biotechnological applications over non-biological materials. Current methods of heterologous protein production and the recent developments in small and large-scale purification of VLPs promise the wide application of these nanostructures for medicine in the near future. These new materials coupled to the old protein-modification chemistry and the

recent development of reagents to modify specific residues in proteins, allows the decoration of VLPs to introduce an extraordinary variety on new features. Such modifications have expanded the value of these particles as imaging aids, vectors for drug delivery and for epitope display to function as vaccines. Current advances are encouraging to investigate new applications for VLPs as innovative tools in medicine and nanotechnology.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICYTDF), Mexico (project PI-FUTP08-104). IBJ received support from the Alexander von Humboldt Foundation, Germany. SPSR received support from CONACYT, Mexico.

## REFERENCES

- Russell SJ, Peng KW. Viruses as anticancer drugs. *Trends Pharmacol Sci* 2007; 28: 326-36.
- Lucas W, Knipe D. In: *Encyclopedia of life sciences. Viral capsids and envelopes: structure and function*. John Wiley and Sons, 2002; 1-7.
- Luo D, Saltzman WM. Synthetic DNA delivery systems. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 33-7.
- Fischlechner M, Donath E. Viruses as building blocks for materials and devices. *Angew Chem Int Ed* 2007; 46: 3184-93.
- Mena JA, Ramírez OT, Palomares LA. Population kinetics during simultaneous infection of insect cells with two different recombinant baculoviruses for the production of rotavirus-like particles. *BMC Biotechnol* 2007; 7: 39.
- Santi L, Huang Z, Mason H. Virus-like particles production in green plants. *Methods* 2006; 40: 66-76.
- Scheerlinck JPY, Greenwooda DLV. Virus-sized vaccine delivery systems. *Drug Discov Today* 2008; 13: 882-7.
- Pattenden LK, Middelberg APJ, Niebert M, Lipin DI. Towards the preparative and large-scale precision manufacture of virus-like particles. *Trends Biotechnol* 2005; 23: 523-9.
- Wang Q, Lin T, Tang L, Johnson JE, Finn MG. Icosahedral virus particles as addressable nanoscale building blocks. *Angew Chem Int Ed* 2002; 41: 459-62.
- Manchester M, Singh P. Virus-based nanoparticles (VNP): Platform technologies for diagnostic imaging. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58: 1505-22.
- Singh P, Gonzalez MJ, Manchester M. Viruses and their uses in nanotechnology. *Drug Dev Res* 2006; 67: 23-41.
- Nam KT, Kim DW, Yoo PJ, *et al.* Virus-enabled synthesis and assembly of nanowires for lithium ion battery electrodes. *Science* 2008; 312: 885-8.
- Huang X, Bronstein LM, Retrum J, *et al.* Self-assembled virus-like particles with magnetic cores. *Nano Lett* 2007; 7: 2407-16.
- Steinmetz NF, Evans DJ. Utilization of plant viruses in bionanotechnology. *Org Biomol Chem* 2007; 5: 2891-902.
- Lipin DI, Chuan YP, Lua LHL, Middelberg APJ. Encapsulation of DNA and non-viral protein changes the structure of murine polyomavirus virus-like particles. *Arch Virol* 2008; 153: 2027-39.
- Flenniken ML, Uchida M, Liepold LO, Kang S, Young MJ, Douglas T. A library of protein cage architectures as nanomaterials. In: Manchester M, Steinmetz NF, Eds. *Viruses and nanotechnology, current topics in microbiology and immunology* 327. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2009; 71-93.
- Steinmetz NF, Lomonosoff GP, Evans DJ. Cowpea mosaic virus for material fabrication: addressable carboxylate groups on a programmable nanoscaffold. *Langmuir* 2006; 22: 3488-90.
- Ochoa WF, Chatterji A, Lin T, Johnson JE. Generation and structural analysis of reactive empty particles derived from an icosahedral virus. *Chem Biol* 2006; 13: 771-8.
- Grgacic EVL, Anderson DA. Virus-like particles: Passport to immune recognition. *Methods* 2006; 40: 60-5.
- Schneemann A, Young MJ. Viral assembly using heterologous expression systems and cell extracts. *Adv Protein Chem* 2003; 64: 1-36.
- Clark KB, Lin SC, Humphrey C, *et al.* Expression and characterization of human group C rotavirus virus-like particles in insect cells. *Virology* 2009; 387: 267-72.
- Lowin T, Raab U, Schroeder J, Franssila R, Modrow S. Parvovirus B19 VP2-proteins produced in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison with VP2-particles produced by baculovirus-derived vector. *J Vet Med B* 2005; 52: 348-52.
- Mukherjee S, Thorsteinsson MV, Johnston LB, DePhillips PA, Zlotnick A. A quantitative description of *in vitro* assembly of human papilloma virus 16 virus-like particles. *J Mol Biol* 2008; 381: 229-37.
- Willits D, Zhao X, Olson N, *et al.* Effects of the cowpea chlorotic mottle bromovirus beta hexamer structure on virion assembly. *Virology* 2003; 306: 280-8.
- Fox JM, Zhao X, Speir JA, Young MJ. Analysis of a salt stable mutant of cowpea chlorotic mottle virus. *Virology* 1996; 222: 115-22.
- Zhao X, Fox JM, Olson NH, Baker TS, Young MJ. *In vitro* assembly of cowpea chlorotic mottle virus from coat protein expressed in *Escherichia coli* and *in vitro*-transcribed viral cDNA. *Virology* 1995; 207: 486-94.
- Bieniossek C, Richmond TJ, Berger I. MultiBac: multigene baculovirus-based eukaryotic protein complex production. In: Coligan JE, Dunn BM, Speicher DW, Wingfield PT Eds. *Current protocols in protein science*, NY: Wiley 2008; 5.20.1-5.20.26.
- D'Aoust MA, Couture MMJ, Charland N, Trépanier S, Landry N, Ors F, Vézina LP. The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza. *Plant Biotechnol J* 2010; 8: 1-13.
- Brumfield S, Willits D, Tang L, Johnson JE, Douglas T, Young M. Heterologous expression of the modified coat protein of cowpea chlorotic mottle bromovirus results in the assembly of protein cages with altered architectures and function. *J Gen Virol* 2004; 85: 1049-53.
- Sun J, Dufort C, Daniel MC, *et al.* Core-controlled polymorphism in virus-like particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 1354-9.
- Maranga L, Cunha A, Clemente J, Cruz P, Carrondo MJT. Scale-up of virus-like particles production: effects of sparging, agitation and bioreactor scale on cell growth, infection kinetics and productivity. *J Biotechnol* 2004; 107: 55-64.
- Lusky M. Good manufacturing practice production of adenoviral vectors for clinical trials. *Hum Gene Ther* 2005; 16: 281-91.
- Rodrigues T, Carvalho A, Carmo M, Carrondo MJT, Alves PM, Cruz PE. Scaleable purification process for gene therapy retroviral vectors. *J Gene Med* 2007; 9: 233-43.
- Peixoto C, Ferreira TB, Carrondo MJT, Cruz PE, Alves PM. Purification of adenoviral vectors using expanded bed chromatography. *J Virol Methods* 2006; 132: 121-6.
- Peabody DS. A viral platform for chemical modification and multivalent display. *J Nanobiotech* 2003; 1: 5.
- Ludwig C, Wagner R. Virus-like particles-universal molecular toolboxes. *Curr Opin Biotechnol* 2007; 18: 537-45.
- Wang Q, Kaltgrad E, Lin T, Johnson JE, Finn MG. Natural supramolecular building blocks: Wild-type cowpea mosaic virus. *Chem Biol* 2002; 9: 805-11.
- Blum AS, Soto CM, Wilson CD, *et al.* An engineered virus as a scaffold for three-dimensional self-assembly on the nanoscale. *Small* 2005; 1: 702-6.
- Wang Q, Lin T, Johnson J, Finn M. Natural supramolecular building blocks: cysteine-added mutants of cowpea mosaic virus. *Chem Biol* 2002; 9: 813-9.
- Destito G, Yeh R, Rae CS, Finn MG, Manchester M. Folic acid-mediated targeting of cowpea mosaic virus particles to tumor cells. *Chem Biol* 2007; 14: 1152-62.
- Zhang Z, Buitenhuis J. Synthesis of uniform silica rods, curved silica wires, and silica bundles using filamentous *fd* virus as a template. *Small* 2007; 3: 424-8.
- Strable E, Finn MG. Chemical modification of viruses and virus-like particles. In: Manchester M, Steinmetz NF, Eds. *Viruses and nanotechnology, current topics in microbiology and immunology* 327. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2009; 1-21.
- Huang Y, Chiang CY, Lee SK, *et al.* Programmable assembly of nanoarchitectures using genetically engineered viruses. *Nano Lett* 2005; 5: 1429-34.

- [44] Chiang CY, Mello CM, Gu J, Silva ECCM, Van Vliet KJ, Belcher AM. Weaving genetically engineered functionality into mechanically robust virus fibers. *Adv Mater* 2007; 19: 826-32.
- [45] Mao C, Flynn, CE, Hayhurst A, *et al.* Viral assembly of oriented quantum dot nanowires. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 6946-51.
- [46] Mao C, Solis DJ, Reiss BD, *et al.* Virus-based toolkit for the directed synthesis of magnetic and semiconducting nanowires. *Science* 2004; 303: 213-7.
- [47] Kuncicky DM, Naik RR, Velev OD. Rapid deposition and long-range alignment of nanocoatings and arrays of electrically conductive wires from tobacco mosaic virus. *Small* 2006; 2: 1462-6.
- [48] Steinmetz NF, Lomonosoff GP, Evans DJ. Decoration of cowpea mosaic virus with multiple, redox-active, organometallic complexes. *Small* 2006; 2: 530-3.
- [49] Lewis JD, Destito G, Zijlstra A, *et al.* Viral nanoparticles as tools for intravital vascular imaging. *Nat Med* 2006; 12: 354-60.
- [50] Rae CS, Khor IW, Wang Q, *et al.* Systemic trafficking of plant virus nanoparticles in mice *via* the oral route. *Virology* 2005; 343: 224-35.
- [51] Gilbert L, Toivola J, White D, *et al.* Molecular and structural characterization of fluorescent human parvovirus B19 virus-like particles. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331: 527-35.
- [52] Boura E, Liebl D, Spisek R, *et al.* Polyomavirus EGFP-pseudocapsids: Analysis of model particles for introduction of proteins and peptides into mammalian cells. *FEBS Lett* 2005; 579: 6549-58.
- [53] Joo K, Lei Y, Lee C, *et al.* Site-specific labeling of enveloped viruses with quantum dots for single virus tracking. *ACS Nano* 2008; 2: 1553-62.
- [54] Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, *et al.* Quantum dots for live cells, *in vivo* imaging and diagnostics. *Science* 2005; 307: 538-44.
- [55] Dixit SK, Goicochea NL, Daniel MC, *et al.* Quantum dot encapsulation in viral capsids. *Nano Lett* 2006; 6: 1993-9.
- [56] Medintz I, Sapsford KE, Konnerth JH, *et al.* Decoration of discretely immobilized cowpea mosaic virus with luminescent quantum dots. *Langmuir* 2005; 21: 5501-10.
- [57] Garcea RL, Gissmann L. Virus-like particles as vaccines and vessels for the delivery of small molecules. *Curr Opin Biotech* 2004; 15: 513-7.
- [58] Chen C, Daniel MC, Quinkert ZT, *et al.* Nanoparticle-templated assembly of viral protein cages. *Nano Lett* 2006; 6: 611-6.
- [59] Douglas T, Young M. Host-guest encapsulation of materials by assembled virus protein cages. *Nature* 1998; 393: 152-5.
- [60] Comellas-Aragones M, Engelkamp H, Claessen VI, *et al.* A virus-based single-enzyme nanoreactor. *Nat Nanotechnol* 2007; 2: 635-9.
- [61] Dragnea B, Chen C, Kwak ES, Stein B, Kao CC. Gold nanoparticles as spectroscopic enhancers for *in vitro* studies on single viruses. *J Am Chem Soc* 2003; 125: 6374-5.
- [62] Chen C, Kwak ES, Stein B, Kao CC, Dragnea B. Packaging of gold particles in viral capsids. *J Nanosci Nanotechnol* 2005; 5: 2029-33.
- [63] Takahashi R, Kanesashi S, Inoue T, *et al.* Presentation of functional foreign peptides on the surface of SV40 virus-like particles. *J Biotechnol* 2008; 135: 385-92.
- [64] Noad R, Roy P. Virus-like particles as immunogens. *Trends Microbiol* 2003; 11: 438-44.
- [65] Chatterji A, Ochoa W, Shamieh L, *et al.* Chemical conjugation of heterologous proteins on the surface of cowpea mosaic virus. *Bioconj Chem* 2004; 15: 807-13.
- [66] Takamura S, Niikura M, Li TC, *et al.* DNA vaccine-encapsulated virus-like particles derived from an orally transmissible virus stimulate mucosal and systemic immune responses by oral administration. *Gene Ther* 2004; 11: 628-35.
- [67] Bai B, Hu Q, Hu H, *et al.* Virus-like particles of SARS-like coronavirus formed by membrane proteins from different origins demonstrate stimulating activity in human dendritic cells. *PLoS One* 2008; 3: e2685.
- [68] Lowy DR, Schiller JT. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest* 2006; 116: 1167-73.
- [69] Coates T, Wilson R, Patrick G, André F, Watson V. Hepatitis B vaccines: assessment of the seroprotective efficacy of two recombinant DNA vaccines. *Clin Ther* 2001; 23: 392-403.
- [70] Mullen GE, Ellis RD, Miura K, *et al.* Phase I trial of AMA1-C1/Alhydrogel plus CPG 7909: an asexual blood-stage vaccine for *Plasmodium falciparum* malaria. *PLoS One* 2008; 3: e2940.
- [71] Haynes JR. Influenza virus-like particle vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2009; 8: 435-45.
- [72] Hayden FG, Howard WA, Palkonyay L, Kienny MP. Report of the 5th meeting on the evaluation of pandemic influenza prototype vaccines in clinical trials World Health Organization, Geneva, Switzerland, 12-13 February 2009. *Vaccine* 2009; 27: 4079-89.
- [73] Yamada T, Iwasaki Y, Tada H, *et al.* Nanoparticles for the delivery of genes and drugs to human hepatocytes. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 885-90.
- [74] Dalsgaard K, Uttenthal A, Jones TD, *et al.* Plant-derived vaccine protects target animals against a viral disease. *Nat Biotechnol* 1997; 15: 248-52.
- [75] McLain L, Durrani Z, Wisniewski LA, Porta C, Lomonosoff GP, Dimmock NJ. Stimulation of neutralizing antibodies to human immunodeficiency virus type 1 in three strains of mice immunized with a 22 amino acid peptide of gp41 expressed on the surface of a plant virus. *Vaccine* 1996; 14: 799-810.
- [76] Khor IW, Lin T, Landgedijk JPM, Johnson JE, Manchester M. Novel strategy for inhibiting viral entry by use of a cellular receptor-plant virus chimera. *J Virol* 2002; 7: 4412-19.
- [77] Ulrich R, Nassal M, Meisel H, Kruger DH. Core particles of hepatitis B virus as carrier for foreign epitopes. *Adv Virus Res* 1998; 50: 141-82.
- [78] Oh YK, Sohn T, Park JS, *et al.* Enhanced mucosal and systemic immunogenicity of human papillomavirus-like particles encapsidating interleukin-2 gene adjuvant. *Virology* 2004; 328: 266-73.
- [79] Malboeuf CM, Simon DAL, Lee YE, *et al.* Human papillomavirus-like particles mediate functional delivery of plasmid DNA to antigen presenting cells *in vivo*. *Vaccine* 2007; 25: 3270-6.
- [80] Inoue T, Kawano M, Takahashi R, *et al.* Engineering of SV40-based nano-capsules for delivery of heterologous proteins as fusions with the minor capsid proteins VP2/3. *J Biotechnol* 2008; 134: 181-92.
- [81] Yamada T, Ueda M, Seno M, Kondo A, Tanizawa K, Kuroda S. Novel tissue and cell type-specific gene/drug delivery system using surface engineered hepatitis B virus nano-particles. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2004; 4: 163-7.
- [82] Phelps JP, Dao P, Jin H, Rasochova L. Expression and self-assembly of cowpea chlorotic mottle virus-like particles in *Pseudomonas fluorescens*. *J Biotechnol* 2007; 128: 290-6.
- [83] Phelps JP, Dang N, Rasochova L. Inactivation and purification of cowpea mosaic virus-like particles displaying peptide antigens from *Bacillus anthracis*. *J Virol Methods* 2007; 141: 146-53.
- [84] Freivalds J, Rumnieks J, Ose V, Renhofa R, Kazaks A. High-level expression and purification of bacteriophage GA virus-like particles from yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *Acta Univ Latviensis* 2008; 745: 75-85.
- [85] Senger T, Schädlich L, Gissmann L, Müller M. Enhanced papillomavirus-like particle production in insect cells. *Virology* 2009; 388: 344-53.
- [86] Chen XS, Casini G, Harrison SC, Garcea RL. Papillomavirus capsid protein expression in *Escherichia coli*: Purification and assembly of HPV11 and HPV16L1. *J Mol Biol* 2001; 307: 173-82.
- [87] Singh P, Destito G, Scheemann A, Manchester M. Canine parvovirus-like particles, a novel nanomaterial for tumor targeting. *J Nanobiotech* 2006; 4: 2.
- [88] Lowin T, Raab U, Schroeder J, Franssila R, Modrow S. Parvovirus B19 VP2-proteins produced in *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison with VP2-particles produced by baculovirus-derived vector. *J Vet Med B* 2005; 52: 348-52.
- [89] Michel PO, Mäkelä AR, Korhonen E, *et al.* Purification and analysis of polyhistidine-tagged human parvovirus B19 VP1 and VP2 expressed in insect cells. *J Virol Methods* 2008; 152: 1-5.
- [90] Maranga L, Rueda P, Antonis AFG, *et al.* Large scale production and downstream processing of a recombinant porcine parvovirus vaccine. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002; 59: 45-50.
- [91] Molinari P, Peralta A, Taboga O. Production of rotavirus-like particles in *Spodoptera frugiperda* larvae. *J Virol Methods* 2007; 147: 364-7.
- [92] Bertelotti-Ciarlet A, Ciarlet M, Crawford SE, Conner ME, Estes MK. Immunogenicity and protective efficacy of rotavirus 2/6-virus-like particles produced by a dual baculovirus expression vector and administered intramuscularly, intranasally, or orally to mice. *Vaccine* 2003; 21: 3885-900.



- [93] Kanesashi S, Ishizu K, Kawano M, *et al.* Simian virus 40 VP1 capsid protein forms polymorphic assemblies *in vitro*. *J Gen Virol* 2003; 84: 1899-905.
- [94] Peabody DS. A viral platform for chemical modification and multivalent display. *J Nanobiotech* 2003; 1: 5.
- [95] Legendre D, Fastrez J. Production in *Saccharomyces cerevisiae* of MS2 virus-like particles packaging functional heterologous mRNAs. *J Biotechnol* 2005; 117: 183-94.
- [96] Mortola E, Roy P. Efficient assembly and release of SARS coronavirus-like particles by a heterologous expression system. *FEBS Lett* 2004; 576: 174-8.
- [97] Greco R, Michel M, Guetard D, *et al.* Production of recombinant HIV-1/HBV virus-like particles in *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* plants for a bivalent plant-based vaccine. *Vaccine* 2007; 25: 8228-40.
- [98] Buonaguro L, Buonaguro FM, Tornesello ML, *et al.* High efficient production of Pr55gag virus-like particles expressing multiple HIV-1 epitopes, including a gp120 protein derived from an Ugandan HIV-1 isolate of subtype A. *Antivir Res* 2001; 49: 35-47.
- [99] Natilla A, Nemchinov LG. Improvement of PVX/CMV CP expression tool for display of short foreign antigens. *Protein Expres Purif* 2008; 59: 117-21.
- [100] Wróbel B, Yosef Y, Oppenheim AB, Oppenheim A. Production and purification of SV40 major capsid protein (VP1) in *Escherichia coli* strains deficient for the GroELS chaperone machine. *J Biotechnol* 2000; 84: 285-9.
- [101] Wu M, Sherwin T, Brown WL, Stockley PG. Delivery of antisense oligonucleotides to leukemia cells by RNA bacteriophage capsids. *Nanomedicine NBM* 2005; 1: 67-76.
- [102] Bergsdorf C, Beyer C, Umansky V, Werr M, Sapp M. Highly efficient transport of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester into COS7 cells using human papillomavirus-like particles. *FEBS Lett* 2003; 536: 120-24.
- [103] Goldmann C, Petry H, Frye S, *et al.* Molecular cloning and expression of major structural protein VP1 of human polyomavirus JC virus: formation of virus-like particles useful for immunological and therapeutic studies. *J Virol* 1999; 73: 4465-69.
- [104] Gilbert L, Toivola J, Väililehto O, *et al.* Truncated forms of viral VP2 proteins fused to EGFP assemble into fluorescent parvovirus-like particles. *J Nanobiotech* 2006; 4: 13.
- [105] Morón G, Rueda P, Casal I, Leclerc C. CD8 $\alpha$ CD11b<sup>+</sup> dendritic cells present exogenous virus-like particles to CD8<sup>+</sup>T cells and subsequently express CD8 $\alpha$  and CD205 molecules. *J Exp Med* 2002; 195: 1233-45.
- [106] Lee KW, Tan WS. Recombinant hepatitis B virus core particles: Association, dissociation and encapsidation of green fluorescent protein. *J Virol Methods* 2008; 151: 172-80.
- [107] Tegerstedt K, Andreasson K, Vlastos A, Hedlund KO, Dalianis T, Ramqvist T. Murine pneumotropic virus VP1 virus-like particles (VLPs) bind to several cell types independent of sialic acid residues and do not serologically cross react with murine polyomavirus VP1 VLPs. *J Gen Virol* 2003; 84: 3443-52.
- [108] Leb VM, Jahn-Schmid B, Kueng HJ, *et al.* Modulation of allergen-specific T-lymphocyte function by virus-like particles decorated with HLA class II molecules. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124: 121-8.