



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**“MODIFICACIÓN DE ASAS SUPERFICIALES DE LA PROTEÍNA VP2:
EFECTOS EN LA FORMACIÓN DE PARTÍCULAS TIPO VIRUS”**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:
DIANA RAQUEL AGUILAR MORALES**

TUTOR PRINCIPAL:

**DR. ISMAEL BUSTOS JAIMES
FACULTAD DE MEDICINA (UNAM)**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

**DR. ENRIQUE GARCÍA HERNÁNDEZ
INSTITUTO DE QUÍMICA (UNAM)**

**DRA. BEATRÍZ GÓMEZ GARCÍA
FACULTAD DE MEDICINA (UNAM)**

MÉXICO, D. F. ENERO, 2014



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.

COMITÉ EVALUADOR DEL PROYECTO “MODIFICACIÓN DE ASAS SUPERFICIALES DE LA PROTEÍNA VP2: EFECTOS EN LA FORMACIÓN DE PARTÍCULAS TIPO VIRUS”

PRESIDENTE: Dra. Georgina Garza Ramos Martínez

SECRETARIO: Dra. Gloria Saab Rincón

VOCAL: Dra. Adela Rodríguez Romero

VOCAL: Dra. Leticia Ramírez Silva

VOCAL: Dr. Miguel Costas Basín

SITIO DONDE SE DESARROLLARON LAS ACTIVIDADES EXPERIMENTALES:
LABORATORIO DE FISICOQUÍMICA E INGENIERÍA DE PROTEÍNAS.
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA. FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

ASESOR PRINCIPAL DEL PROYECTO:

DR. ISMAEL BUSTOS JAIMES

TUTOR:

DR. ENRIQUE GARCÍA HERNÁNDEZ

TUTORA:

DRA. BEATRIZ GÓMEZ GARCÍA

SUSTENTANTE:

BIÓL. DIANA RAQUEL AGUILAR MORALES

ESTE PROYECTO CONTÓ CON EL APOYO DE CONACYT QUE OTORGÓ UNA BECA DE MANUTENCIÓN PARA REALIZAR SUS ESTUDIOS DE MAESTRÍA A DIANA RAQUEL AGUILAR MORALES CON NÚMERO DE REGISTRO (CVU/BECARIO): 367871/245639. TAMBIÉN SE CONTÓ CON EL APOYO DE LOS PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN DE CONACYT CON LAS CLAVES CB-2010-151189-Z Y CB-2008-01-099857, ASÍ COMO DEL PROYECTO IN215613 DEL PROGRAMA DE APOYO A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN TECNOLÓGICA (PAPIIT) DE LA UNAM.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por su apoyo. Gracias a mi papá el Sr. Andrés Aguilar Aguilar, quien siempre me impulsó desde niña a seguir adelante para alcanzar mis metas. A mi mamá Sra. Guillermina Morales Hernández, quien ha sido un ejemplo de la superación de una mujer indígena que afronta con valor los retos. Y a mi hermana Srita. María de los Ángeles Aguilar Morales, por su paciencia y sabiduría ante la vida, sus palabras son un aliciente para ser siempre una mejor persona.

Así también le agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por permitir que más personas se superen profesionalmente. Gracias a CONACYT por la beca de manutención, que me permitió dedicarle tiempo completo al proyecto. En este proyecto de tesis agradezco al Dr. Ismael Bustos Jaimes por la oportunidad que me dio para formar parte de su equipo de colaboradores. Gracias a la Dra. Beatriz Gómez por sus aportaciones y por su sensibilidad para exponer sus comentarios. También al Dr. Enrique García por apoyar el proyecto para que terminara bien, muchas gracias.

Gracias a los integrantes del comité evaluador de la presente tesis: Presidenta: Dra. Georgina Garza Ramos Martínez; Secretaria: Dra. Gloria Saab Rincón; Vocal: Dra. Adela Rodríguez Romero; Vocal: Dra. Leticia Ramírez Silva; Vocal: Dr. Miguel Costas Basín. Sus comentarios fueron valiosos para mejorar el contenido de este escrito, y sirvieron también como punto de reflexión profesional.

Gracias a las personas del Laboratorio de fisicoquímica e ingeniería de proteínas que mostraron disponibilidad para compartir su tiempo y conocimiento. Gracias por el apoyo técnico de la Dra. Isabel y a la Dra. Laura. Por su generosidad y fortaleza, gracias Anaid. Y especialmente a la Sra. Margarita quien realiza su trabajo con mucha dedicación, para que siempre este limpio el material en el laboratorio.

ÍNDICE

PÁG.

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

ABREVIATURAS

RESUMEN.....	1
1. FUNDAMENTACIÓN	
1.1. CÁPSIDES VIRALES.....	2
1.1.1. PARTÍCULAS TIPO VIRUS.....	7
1.2. ASAS SUPERFICIALES.....	9
1.3. PARVOVIRUS B19.....	11
1.3.1. PROTEÍNA VIRAL 2 DE PARVOVIRUS B19: PARTÍCULAS TIPO VIRUS.....	14
1.3.2. QUIMERAS DE PARTÍCULAS TIPO VIRUS DE PARVOVIRUS B19.....	20
1.4. VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO HUMANO.....	21
1.4.1. PROTEÍNA F DEL VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO HUMANO.....	22
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
3. JUSTIFICACIÓN.....	28
4. HIPÓTESIS.....	29
5. OBJETIVOS	
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	30
5.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	30
6. DIAGRAMA GENERAL DEL MÉTODO EXPERIMENTAL.....	31

ÍNDICE (CONTINUACIÓN)

	PÁG.
7. MÉTODO EXPERIMENTAL DESARROLLADO	
7.1. SELECCIÓN DE ASAS SUPERFICIALES DE LA PROTEÍNA VP2 DE PARVOVIRUS B19.....	32
7.2. MODIFICACIÓN DEL GEN VP2 DEL PARVOVIRUS B19: DISEÑO DE LOS GENES QUIMÉRICOS E INTRODUCCIÓN DE LA SECUENCIA QUIMÉRICA SINTÉTICA EN EL VECTOR pET22b(+)	34
7.3. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA VP2 SILVESTRE Y DE LAS PROTEÍNAS QUIMERAS.....	35
7.3.1. RENATURALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE Y AUTOENSAMBLADO DE PARTÍCULAS TIPO VIRUS.....	39
7.4. EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE LAS VLPs	
7.4.1. DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DDL).....	39
7.4.2. GRADIENTE DE CLORURO DE CESIO (CsCl).....	40
7.4.3. EFECTO DEL GuHCl EN EL DESENSAMBLE DE LAS VLPs.....	41
8. RESULTADOS Y ANÁLISIS	
8.1. SELECCIÓN DE ASAS SUPERFICIALES DE LA PROTEÍNA VP2 DE PARVOVIRUS B19.....	42
8.1.1. SECUENCIAS FORÁNEAS Y SITIOS DE INSERCIÓN DENTRO DE LAS ASAS 62-75, 265-271, Y 300-314.....	45
8.2. MODIFICACIÓN DEL GEN VP2 DE PARVOVIRUS B19	
8.2.1. INTRODUCCIÓN DE LA SECUENCIA QUIMÉRICA EN EL VECTOR pET22b(+)	46
8.3. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA RECOMBINANTE EN <i>E. coli</i> Y PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD.....	47
8.3.1. PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD.....	48

ÍNDICE (CONTINUACIÓN)

	PÁG.
8.4 EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE LAS VLPs	
8.4.1 TAMAÑO DE PARTÍCULA: DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ.....	51
8.4.2 DENSIDAD DE LAS PARTÍCULAS: GRADIENTE DE CLORURO DE CESIO.....	57
8.4.3 EFECTO DEL GuHCl EN EL DESENSAMBLE DE LAS VLPs.....	58
9. CONCLUSIONES PRELIMINARES	62
10. PERSPECTIVAS.....	63
11. REFERENCIAS.....	64
12. ANEXO. SECUENCIAS Y DATOS DIVERSOS	
12.1 ANÁLISIS DESARROLLADO DE LA SELECCIÓN DE ASAS.....	69
12.1.1 COEFICIENTES B Y ASAS SUPERFICIALES.....	69
12.1.2 NÚMERO DE CONTACTOS (VIPER).....	70
12.1.3 ALINEAMIENTO ESTRUCTURAL	
12.1.3.1 TAXONOMÍA DE LA FAMILIA <i>PARVOVIRIDAE</i>	72
12.1.3.2 ALINEAMIENTO ESTRUCTURAL CON FATCAT.....	73
12.1.3.3 ALINEAMIENTO ESTRUCTURAL DE KAUFMANN.....	76
12.2 GEN <i>VP2</i> , GEN <i>F</i> DEL VSR Y GENES QUIMÉRICOS.....	78
12.3 SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LA PROTEÍNA F DEL VSR, <i>VP2</i> DEL PARVOVIRUS B19 Y DE LAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS.....	79
12.4 MAPA DEL PLÁSMIDO pET- 22b(+) Y PLÁSMIDOS QUIMÉRICOS SINTÉTICOS.....	80
12.5 PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA <i>VP2</i> Y QUIMERAS POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	PÁG.
FIGURAS	
FIG. 1. CÁPSIDE ICOSAÉDRICA DEL CCMV.....	4
FIG. 2. PROPIEDADES DEL ICOSAEDRO.....	5
FIG. 3. MODELO DE ENSAMBLADO DE CÁPSIDES.....	6
FIG. 4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA MOSTRANDO VLPs DEL PARVOVIRUS B19.....	12
FIG. 5. MAPA DE TRANSCRIPCIÓN DE LOS PRINCIPALES GENES DE PARVOVIRUS B19.....	13
FIG. 6. ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LA PROTEÍNA VP2 Y VLP DE PARVOVIRUS B19.....	15
FIG. 7. ALINEAMIENTO ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA VP2 DE PARVOVIRUS B19 CON VIRUS RELACIONADOS.....	16
FIG. 8. ESTRUCTURA DEL VSR HUMANO.....	22
FIG. 9. MODELO CRISTALOGRAFICO DE UN TRÍMERO DE LA PROTEÍNA F DEL VSR.....	25
FIG.10. ASAS SUPERFICIALES ANALIZADAS DENTRO DE LA ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA VP2.....	43
FIG.11. ALINEAMIENTO ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA VP2 DE PARVOVIRUS B19 CON AAV-2 Y FPV (DIAGRAMA DE LISTÓN)..	43
FIG.12. ESTRUCTURA CRISTALOGRAFICA DE LA PROTEÍNA F DEL VSR Y LOCALIZACIÓN DEL SITIO ANTIGÉNICO IV	46
FIG.13. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA VP2 SILVESTRE Y PROTEÍNAS QUIMÉRICAS R4A265 Y R4A300.....	48
FIG.14. PROTEÍNA VP2, R4A265 Y R4A300, OBTENIDA DE LA PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD.....	50
FIG.15. DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA EN LA MUESTRA DE VP2 SILVESTRE (pH 7.4).....	52
FIG. 16. DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA EN MUESTRAS DE VP2 SILVESTRE Y PROTEÍNAS QUIMÉRICAS (pH 7.4).....	52
FIG. 17. DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA EN MUESTRAS DE VP2 CON R4A300 (pH 7.4).....	53

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS (CONTINUACIÓN)

	PÁG.
FIG. 18. DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA EN MUESTRAS DE VP2 SILVESTRE Y PROTEÍNAS QUIMÉRICAS (pH 4.0).....	54
FIG.19. DENSIDAD DE LAS PARTÍCULAS ENSAMBLADAS A PARTIR DE LA PROTEÍNA VP2, R4A265 Y R4A300 (PH 7.4).....	57
FIG. 20. EFECTO DEL GuHCl EN EL DESENSAMBLE DE LAS VLPS DE LA PROTEÍNA VP2, R4A265 Y R4A300.....	60

TABLAS

TABLA. 1. RESUMEN DE LA EVALUACIÓN DE ASAS Y GIROS DE LA PROTEÍNA VP2 DE PARVOVIRUS B19.....	44
TABLA. 2. SITIO EN LA ASA 265-271 Y 300-314 DONDE SE REALIZÓ LA MODIFICACIÓN DE LA SECUENCIA DE LA PROTEÍNA VP2 DE PARVOVIRUS B19.....	45
TABLA 3. RENDIMIENTO DE PROTEÍNA OBTENIDA EN EL PROCESO DE PURIFICACIÓN DE VP2, R4A265 y R4A300.....	49
TABLA.4. PORCENTAJE DE PROTEÍNA SOLUBLE VP2, R4A265 Y R4A300, RECUPERADO DE LA DIÁLISIS AL EQUILIBRIO Y DE LA MICROFILTRACIÓN.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS EN ANEXOS

	PÁG.
FIG. A1. ESQUEMA DE LAS DISTINTAS INTERCARAS DE LA CÁPSIDE DEL PARVOVIRUS B19.....	69
Fig. A2.TAXONOMÍA COMPLETA DE LA FAMILIA <i>PARVOVIRIDAE</i>	72
FIG.A3. ALINEAMIENTO ESTRUCTURAL DE LA SECUENCIA CORRESPONDIENTE AL ASA DE LOS RESIDUOS 62 A 75.....	76
FIG.A4. ALINEAMIENTO ESTRUCTURAL DE LA SECUENCIA CORRESPONDIENTE AL ASA DE LOS RESIDUOS 265 A 271.....	77
FIG.A5. ALINEAMIENTO ESTRUCTURAL DE LA SECUENCIA CORRESPONDIENTE AL ASA DE LOS RESIDUOS 300-314.....	77
FIG. A6. PLÁSMIDO DE EXPRESIÓN pET22b(+)......	80
Fig. A7. PLÁSMIDO GS51485-4 pBSK-R4A265.....	80
Fig. A8. PLÁSMIDO GS51485-4 pBSK-R4A300.....	81
FIG. A9. ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS EXPRESADAS POR LA COLONIA R4A300-2 Y LA COLONIA R4A265-2.....	81
FIG. A10. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA VP2.....	82
TABLA A1. RESUMEN DEL ANÁLISIS DE COEFICIENTES B DE LAS ASAS SUPERFICIALES E INTERACCIÓN CON ASAS PRÓXIMAS.....	69
TABLA A2. CONTACTOS ENTRE RESIDUOS DE LAS ASAS DE LA ESTRUCTURA CRISTALOGRÁFICA (1S58).....	70
TABLA A3. RESUMEN DE LOS CONTACTOS ENTRE RESIDUOS QUE FORMAN LAS ASAS SUPERFICIALES.....	71
TABLA A4. RESUMEN DEL ANÁLISIS DEL ALINEAMIENTO ESTRUCTURAL DE LAS ASAS SUPERFICIALES E INTERACCIÓN CON ASAS PRÓXIMAS.....	77

ABREVIATURAS, SIGLAS Y CÓDIGOS

aa	Aminoácidos.
AAV	Virus Adeno-Asociado.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
Å	Angstroms.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
B19	Parvovirus B19.
CATH	Class, Architecture, Topology, Homology. Es una base de datos de clasificación jerárquica de estructuras de proteínas de dominio, utilizando curación manual usando una variedad de clasificaciones y algoritmos de predicción.
CCMV	Cowpea Chlorotic Mottle Virus. Virus del moteado clorótico del caupí (Frijol caupí).
CsCl	Cloruro de cesio.
C-terminal	Extremo carboxilo terminal de la proteína.
DDL, DLS	Dispersión Dinámica de Luz. Dynamic Light Scattering.
DTT	DL-ditiotreitol.
D.O.₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm de longitud de onda.
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> .
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
FPV	Feline panleukopenia virus. Virus de la panleucopenia felina.
FATCAT	Flexible structure alignment by chaining aligned fragment pairs allowing twists. Alineamiento de estructural flexible por encadenamiento de pares de fragmentos alineados admitiendo giros.
fF	Fragmentos inmunogénicos de la proteína F del Virus Sincicial Respiratorio Humano.
GuHCl	Cloruro de guanidinio.
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses. Comité Internacional de Taxonomía de Virus.
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside. Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido.
LB	Luria Bertani. Medio nutritivo Luria.
mM	Milimolar.
µg, µL	Microgramos, µg. Microlitros, µL.
MVM	Minute Virus of Mice. Virus diminuto del ratón. Parvovirus diminuto del ratón.
nm	Nanómetros.

ABREVIATURAS, SIGLAS Y CÓDIGOS (CONTINUACIÓN)

Ni-TED	Níquel-tris (carboxymethyl) ethylene diamine. Resina usada como matriz de afinidad con níquel y un grupo quelante.
N-terminal	Extremo aminoácido terminal de la proteína. Extremo amino-terminal.
pET22b(+)	Plásmido, que es usado como vector de expresión de proteínas recombinantes; el cual transporta una secuencia <i>pelB</i> como señal en el extremo amino terminal para potencial localización en el periplasma, mas una secuencia opcional de 6 histidinas (His•Tag [®]) en el extremo carboxilo terminal.
pET-VP2-6His	Plásmido pET-22b (+) con la secuencia del gen <i>VP2</i> del parvovirus B19 con codones modificados para expresión en <i>E. coli</i> , que en el extremo 3' (amino-terminal) codifica para 6 residuos de histidina.
PDB	Protein Data Bank. Banco de datos de proteínas.
PtPV	Pig-tailed macaque parvovirus. (Acceso no. AAF61214). Parvovirus del macaco cola de puerco.
PyMol	Es un visor molecular de código abierto, para producir imágenes 3D de alta calidad de moléculas pequeñas y de macromoléculas biológicas. La "Py" hace referencia al lenguaje de programación Python, que le permite el análisis complejo a través del acceso a bibliotecas disponibles para Python.
r.p.m.; rpm	Revoluciones por minuto.
R4A265	Gen <i>VP2</i> de parvovirus modificado con una inserción del gen <i>F</i> del VSR. El gen codifica para una proteína <i>VP2</i> recombinante cuya estructura en asa próxima al aminoácido 265 transporta parte de la región 4 de la proteína <i>F</i> del VSR.
R4A300	Gen <i>VP2</i> de parvovirus modificado con una inserción del gen <i>F</i> del VSR. El gen codifica para una proteína <i>VP2</i> recombinante cuya estructura en asa próxima al aminoácido 300 transporta parte de la región 4 de la proteína <i>F</i> del VSR.
RhPV	Rhesus macaque parvovirus. (Acceso no. AAF61211). Parvovirus del mono Rhesus.
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato Sódico.
SPV	Nonhuman Primate Erythroviruses Simian Parvovirus (acceso no. AAA74975). Parvovirus de simio de eritrovirus de primates no humanos.
TMV	Tobacco mosaic virus. Virus del Mosaico del Tabaco.
VIPERdb	Virus Particle ExploreR. Es una base de datos para estructuras de cápside de virus icosaédricos.
VP2-fF	Proteína recombinante <i>VP2</i> (del parvovirus B19) quimérica que portan en alguna de sus asas superficiales fragmentos inmunogénicos de la proteína <i>F</i> del Virus Sincicial Respiratorio.

ABREVIATURAS, SIGLAS Y CÓDIGOS (CONTINUACIÓN)

VLPs, VLP	Virus-like particles. Partículas tipo virus (PTV).
VSR, VSRH, RSV	Virus Sincicial Respiratorio, Virus Sincicial Respiratorio Humano. Respiratory Syncytial Virus.
VP1	Proteína viral 1; Proteína estructural de cápside viral 1.
VP2	Proteína viral 2; Proteína estructural de cápside viral 2.
VP2-6His	Proteína viral 2 unida a una cola de 6 histidinas.
V9	Human erythrovirus V9. (Acceso no. NP 694865). Eritrovirus Humano de tipo V9.
1DNV	Estructura cristalográfica de la proteína de la cápside de <i>Galleria mellonella</i> densovirus. Densovirus de la polilla de la cera.
2G86	Estructura cristalográfica de la proteína de cápside del virus Adeno-Asociado serotipo 4 (AAV-4).
2QA0	Estructura cristalográfica de la proteína de cápside del virus Adeno-Asociado serotipo 8 (AAV-8).
1LP3	Estructura cristalográfica de la proteína de cápside del virus Adeno-asociado tipo 2 (AAV-2).

RESUMEN

Las partículas tipo virus representan un vehículo molecular para la presentación de antígenos y para la entrega de moléculas en células específicas. En este proyecto se realizó la inserción de fragmentos inmunogénicos de la proteína F del virus sincicial respiratorio humano en las asas superficiales de la partícula tipo virus formada con la proteína viral 2 recombinante de parvovirus B19. El objetivo del proyecto fue estudiar el efecto de la incorporación de estos fragmentos en la formación de las partículas tipo virus, que permitió reconocer algunas asas que son susceptibles a ser modificadas sin alterar significativamente el ensamblado de estas partículas.

Se seleccionaron diversas asas de la proteína viral 2 que están expuestas en la superficie de la partícula tipo virus, tomando como criterios las propiedades estructurales derivadas de la estructura cristalográfica, como son la exposición del asa en la superficie, la participación del asa en la formación de contactos entre monómeros, la energía asociada a dichos contactos y la propensión de esa asa a cambiar de longitud de acuerdo a un alineamiento de secuencias homólogas. Por síntesis química se obtuvieron los genes de la proteína viral 2, modificados con la secuencia de nucleótidos que codifica para los fragmentos inmunogénicos de la proteína F en las asas superficiales previamente seleccionadas. Los genes quiméricos se insertaron en un vector de expresión pET22b(+) para inducir en *Escherichia coli* la expresión de las proteínas quiméricas con residuos de histidina en el extremo amino terminal. La proteína viral 2 y las quimeras recombinantes de la proteína viral 2 formaron cuerpos de inclusión en *E. coli*, por lo que se resuspendieron en presencia de agentes caotrópicos. Las proteínas quiméricas recombinantes se purificaron por cromatografía de afinidad utilizando una columna con matriz de níquel en condiciones desnaturizantes y se evaluó su capacidad para formar partículas tipo virus, mediante métodos fisicoquímicos como son la dispersión dinámica de luz y la ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio. El autoensamble de las partículas tipo virus se realizó mediante la eliminación gradual del agente caotrópico por diálisis al equilibrio.

1 FUNDAMENTACIÓN

1.1. CÁPSIDES VIRALES

Los virus son entidades dinámicas, no autoreplicables, de tamaño nanométrico, caracterizadas por estar formadas por múltiples copias de subunidades idénticas de proteínas dispuestas en forma de escudo. Esta cubierta contiene ácido desoxirribonucleico (ADN) o ribonucleico (ARN), ya sea de cadena doble o sencilla y, de sentido positivo o negativo, el cual porta la información mínima necesaria para la replicación viral. En este genoma están codificados los genes de varias proteínas: las proteínas denominadas estructurales que constituyen la partícula viral completa o virión, y las proteínas no estructurales que intervienen en el proceso de replicación del virus pero no conforman las partículas virales (Johnson, 1996).

En los virus no envueltos (sin membranas lipídicas) las proteínas estructurales más expuestas al medio constituyen la cápside; las cuales además de exhibir en conjunto propiedades mecánicas complejas para cumplir una función estructural y de transporte del genoma, también poseen características particulares esenciales para establecer interacciones para el reconocimiento celular y en el proceso de entrada viral (Katen & Zlotnick, 2009; Chen et al., 2010).

El ensamblado supramolecular de la cápside es posible a partir del armado de subunidades de proteínas asociadas llamadas "unidades estructurales" o "capsómeros" (formados por uno o varios tipos de cadenas de polipéptidos) en un arreglo donde se favorecen las interacciones no covalentes (interacciones iónicas, dipolares, fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno), para formar un enrejado global y estable, con un estado de mínima energía libre, que presenta propiedades diferentes a las exhibidas por una sola subunidad. En este proceso molecular de acercamiento, reorientación y crecimiento, la morfología de las estructuras resultantes es influenciada y determinada por el efecto de la fuerza iónica y la fluctuación de las interacciones coloidales de las proteínas (Chi et al., 2003; Dance, 2003; Albrecht, 2007; Katen & Zlotnick, 2009; Uhlenheuer et al., 2010).

Datos fisicoquímicos sugieren que las subunidades de proteínas son muy flexibles antes de incorporarse en la cápside, de tal manera que todas las subunidades de la

proteína pueden adoptar conformaciones diferentes, dependiendo de su posición dentro de la cápside, ya que toda la información necesaria para controlar este cambio está disponible para la subunidad a nivel local. Según la teoría de la cuasiequivalencia propuesta por Caspar y Klug, generalmente para adoptar la estructura cuasi-equivalente se requiere de la presencia de interruptores o cambiadores moleculares (switch), como el ácido nucleico ó iones metálicos, para controlar la formación de hexámeros o pentámeros y para determinar la localización de las diferentes unidades morfológicas en el enrejado superficial (Johnson, 1996; Prevelige, 1998; Steven et al., 1997; Hicks & Henley, 2006; Albrecth, 2007; Katen & Zlotnick, 2009; Chuan et al., 2010).

En general, el proceso de ensamble de las cápsides de virus tiende a ser dirigido por el ocultamiento de superficies hidrofóbicas en los puntos de contacto entre las intercaras de subunidades, y además se admite que las interacciones hidrofóbicas actúan entre parches apolares sobre las proteínas de la cubierta. Estas pequeñas áreas de contacto favorecen la formación de intermediarios de ensamble mediante la formación de una red de interacciones relativamente débiles (Chi et al., 2003; van der Schoot & Zandi, 2007; Katen & Zlotnick, 2009).

Cabe destacar que en los sistemas de expresión *in vivo* (células), el ensamblado de las cápsides de los virus complejos también es mediado por maduración proteolítica de las proteínas virales, por expresión de elementos de andamiaje o por membranas celulares que funcionan como envoltura (Palucha et al., 2005; van der Schoot & Zandi, 2007; Chen et al., 2010).

Las cápsides virales son estabilizadas por el balance entre las fuerzas de formación y disociación (interacciones de repulsión de Coulomb), por interacciones hidrófobas así como por la formación de un complejo con la carga negativa del genoma. En algunos virus las proteínas de la cápside se unen de tal manera que simulan capas que parecen estar entretrejidas para aumentar la estabilidad (Albrecht, 2007; Katen & Zlotnick, 2009; Chuan et al., 2010; van der Schoot & Zandi, 2007).

La superestructura resultante se caracteriza por ser estable, dinámica y flexible, para permitir cambios de tamaño y forma, facultando la exposición de residuos internos en procesos como la liberación del genoma, que en ocasiones implica la disociación de subunidades (Uhlenheuer et al., 2010; Katen & Zlotnick, 2009).

Ya que existe un número limitado de formas que permiten el ensamble simétrico de subunidades asimétricas de unidades repetitivas, los virus desarrollan básicamente dos tipos de simetría: simetría helicoidal (cápsides alargadas) o simetría icosaédrica. Esta última es la más frecuente y con base en ella los virus crean partículas en el intervalo de tamaño de 200 a 2,000 Å de diámetro, en cuyo espacio reúnen los elementos mínimos requeridos para utilizar el mecanismo de replicación autónomo de ciertos hospedero celulares (Johnston et al., 2010; Luque et al., 2010; Abrescia et al 2012).

La simetría de la cápside icosaédrica ha sido ampliamente estudiada en el virus del moteado clorótico del frijol caupí (CCMV), el virus de la hepatitis B (HBV) y el virus del papiloma humano (HPV). A partir de los datos analizados se han establecido que para adoptar una simetría icosaédrica, el arreglo resulta de distribuir las subunidades sobre la superficie de una esfera (alrededor de los vértices o caras de un cuerpo con simetría cúbica) para generar una estructura simétrica tridimensional. El icosaedro resultante muestra una mezcla del estricto eje de orden 5 y un arreglo de ejes de cuasi-orden 6 (ejes con simetría local pero no global de orden 6). De esta manera los capsómeros en las 12 esquinas del icosaedro tienen una simetría de orden 5 e interactúan con 5 capsómeros vecinos (interacción en pentámeros) y dependiendo del tamaño del genoma, las cápsides pueden estar formadas por más capsómeros; que en tal caso se ubican en un arreglo regular en las caras del icosaedro estableciendo contacto con seis subunidades vecinas (interacción en hexámeros) (**Fig. 1**) (Johnson, 1996; Steven et al., 1997; Johnston et al., 2010; Luque et al., 2010).

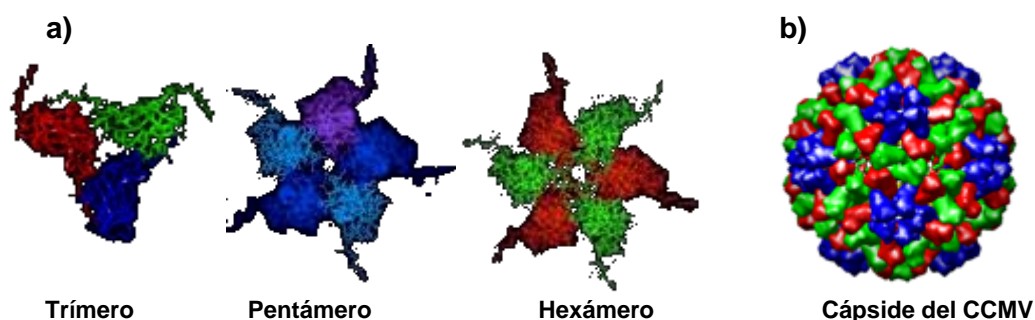


Fig. 1. Diagrama de la cápside icosaédrica del CCMV, donde se distingue el arreglo de las subunidades estructurales. La cápside del CCMV consta de 180 subunidades proteicas. La manera en que las subunidades se agruparan depende de la conformación geométrica que adoptaran unas con otras. **a)** Se reconoce un arreglo de 3 proteínas denominado trímero (unidad generadora de la estructura poliedral), y asociaciones de 5 (pentámero) y 6 proteínas (hexámero). **b)** Disposición de las 180 proteínas asociadas en capsómeros, se distinguen trímeros, pentámeros y hexámeros distribuidos alrededor de la estructura de icosaedro (estructura cristalográfica 1CWP) (Base de datos VIPERdb,2010a)

Para explicar la construcción de cápside de gran tamaño, la teoría de la cuasi-equivalencia propone que en el enrejado hexagonal se pueden distinguir y extraer facetas triangulares formada por un número integral de unidades repetitivas; así que el acomodo y disposición en el icosaedro se da de tal manera que los vértices de cada faceta se repliegan sobre los vértices del enrejado. Pero como las proteínas no tienen la simetría intrínseca de orden 3 de un triángulo equilátero, la cara de una cápside icosaédrica debe consistir de al menos 3 proteínas. De tal manera, que las cápsides de virus son ensambladas con 60 subunidades o un múltiplo de este número (Johnson, 1996; Steven et al., 1997; Luque et al., 2010) (**Fig. 1 y 2**).

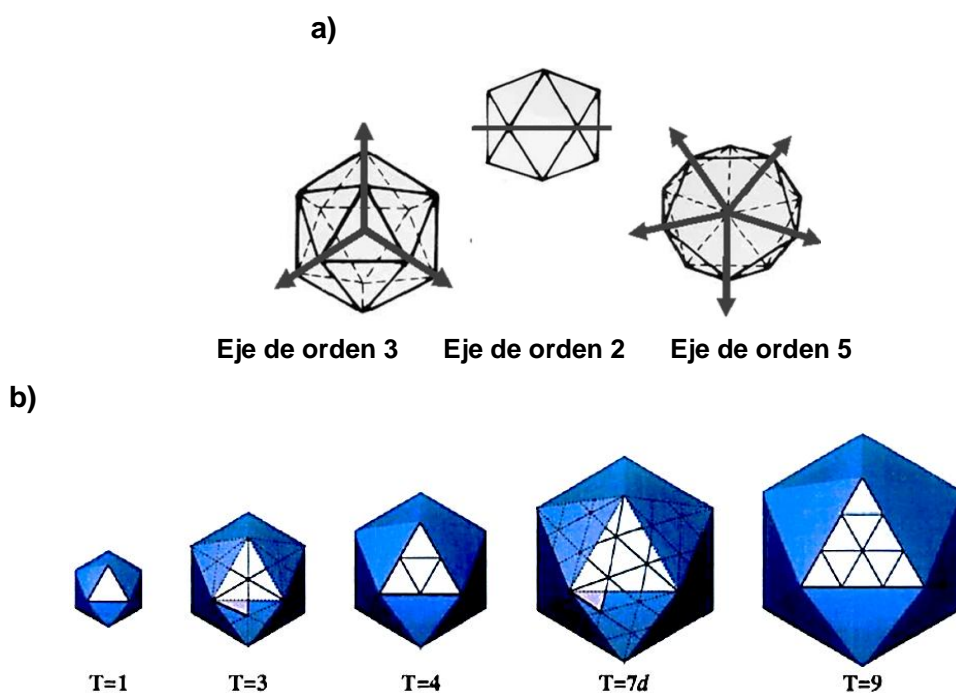


Fig. 2. Propiedades del icosaedro. a) **Simetría icosaedra**, vista de los ejes de simetría. El poliedro sólido icosaédrico está compuesto de 20 caras de triángulos equiláteros con: 20 vértices que corresponden a cada uno de los ejes de simetría de orden 5; 10 ejes de simetría de orden 3 que pasan por las 20 caras triangulares; y 15 ejes de orden 2 que pasan por los 30 límites de contactos entre cada cara. b) **Orden icosaédrico** correspondiente a los números triangulares, T=1, T=3, T=4, T=7d y T=9 (d denota la dextro enantiomorfología). T (número de triangulación) es el número de subunidades en la unidad de repetición asimétrica, tres de las cuales forman una faceta triangular icosaédrica. T múltiplos de 60 unidades asimétricas hacen el icosaedro (Modificado de Steven et al., 1997).

Es oportuno mencionar, sin profundizar, que se ha desarrollado otra teoría para explicar el acomodo de las subunidades en la cápside: Teoría del tejado viral. Esta concibe que la disposición de las subunidades en la superficie de la cápside es determinado por las interacciones biológicas, cuyo resultado es un acomodo que se percibe como un tipo de decorado repetitivo o teselado, el cual es una representación geométrica de interacciones entre subunidades de proteína. En este rompecabezas cada teja o pieza (bloque en forma de trapecio) corresponde a una forma geométrica

donde la subunidad de proteína es indicada esquemáticamente como puntos. Esta teoría explica la disposición de las subunidades en cápsides de tamaños grandes como en el virus del papiloma humano, cuyo acomodo es difícil de explicar si se conciben solo en facetas triangulares (Twarock, 2005; Mannige & Brooks, 2008).

En tanto que para explicar los posibles mecanismos en que se realiza la adición de subunidades para formar la cápside viral se han elaborado varios modelos experimentales basados en dos teorías; teoría de la polimerización macromolecular y teoría termodinámica del ensamblado (**Fig. 3**) (Katen & Zlotnick, 2009; Prevelige 1993).

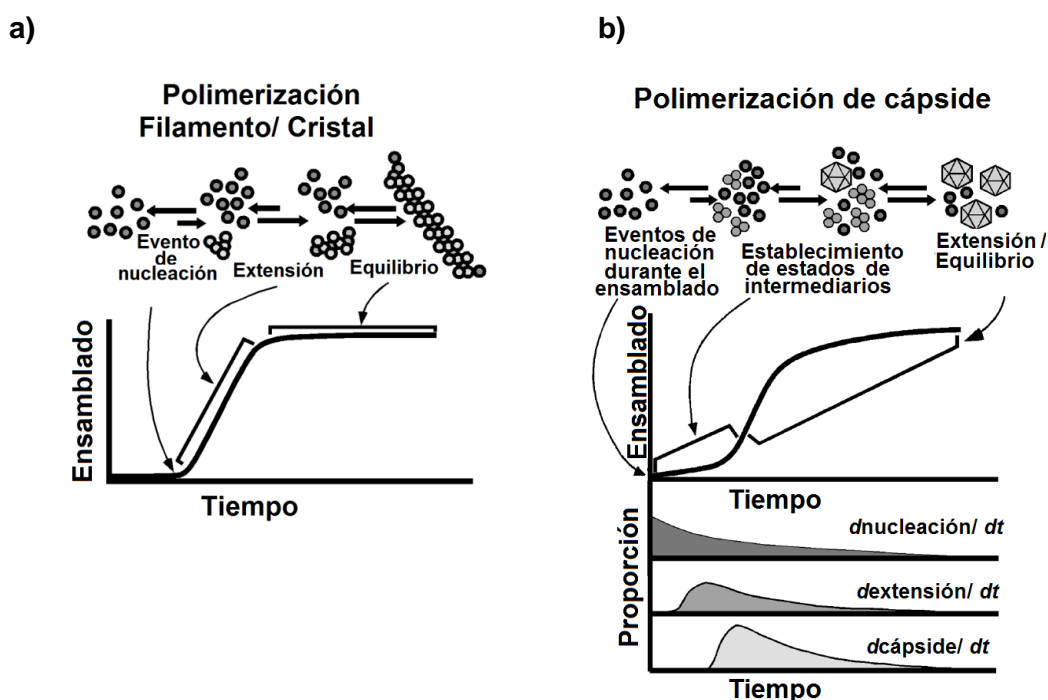


Fig. 3. Modelo de ensamblado de cápsides. a) **Modelo clásico de nucleación (Teoría de la polimerización macromolecular de cápsides).** El proceso de ensamblado se concibe sobre una plataforma de una composición abierta o polímero infinito; el cual inicia como un único evento de nucleación (primera fase), y posteriormente el polímero es elongado o extendido (fase de crecimiento) por una serie de adiciones rápidas y más o menos estables de subunidades; hasta que el equilibrio entre el polímero y las unidades libres es alcanzado. Por debajo de la concentración crítica de mínimos núcleos no ocurre la polimerización, pues el costo entrópico de inmovilizar las subunidades y el cambio conformacional requerido debe superar la energía de enlace adquirida por la intercara durante su formación. Como el final del polímero permanece "abierto" las subunidades pueden libremente asociarse y disociarse, por lo que se requiere una concentración crítica de subunidades ordenadas para mantener este como única fase. b) **Cinética de cápside (Teoría termodinámica del ensamblado de cápsides).** El ensamblado de una población de cápsides se caracteriza por reacciones recurrentes de competición no sincronizadas entre la nucleación y la extensión; así cada cápside discreta podría originarse de un núcleo individual, el cual al extenderse progresivamente en un intermediario cada vez más completo finalmente se cierra en un icosaedro. La acumulación de intermediarios de gran tamaño, refleja que las reacciones de asociación y disociación son reversibles durante todo el proceso. Arriba: Dispersión de luz de una población de cápsides ensambladas. Abajo: representación de una razón de reacción continua en la población. Una reacción de un solo núcleo da lugar a una cinética sigmoidea donde hay una fase de latencia de las formas núcleo, seguido por la adición rápida de subunidades, y termina en una región plana en estado estacionario en donde la concentración de la subunidad crítica se ha alcanzado. (Tomado de Katen & Zlotnick, 2009 y Prevelige, 1993).

1.1.1 PARTÍCULAS TIPO VIRUS

El interés por estudiar el ensamblado de virus, como el virus del mosaico del tabaco TMV y CCMV, ha llevado al desarrollo de experimentos *in vitro*, en el que se han obtenido reensamblados de viriones infecciosos (con su genoma), y cápsides vacías o también llamadas partículas tipo virus (PTV) o VLPs (Virus-like particles) (Zlotnick & Stray, 2003). Y a partir de estos primeros estudios, se ha reportado la construcción y caracterización de más de 100 diferentes VLPs (esféricas o tubulares), a partir de virus de microbios, plantas, insectos y animales. Estos virus pertenecen a 35 diferentes familias entre las que destacan: *Picornaviridae*, *Calciviridae*, *Hepnaviridae*, *Papoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Flaviviridae*, *Retroviridae*, *Filoviridae*, *Reoviridae*, *Coronaviridae*, *Leviviridae*, *Parvoviridae*, *Birnaviridae*, *Circoviridae*, *Bromoviridae*, y diversos fagos (Mellado et al., 2009; Palucha et al., 2005; van der Schoot & Zandi, 2007; Zeltins, 2013).

La definición de partícula tipo virus (VLP) es muy amplia y ha sido utilizado para referirse a: estructuras no caracterizadas con morfología idéntica o altamente relacionada con un virus nativo que son encontradas en muestras biológicas, y en sistemas celulares usados para producir viriones infecciosos; estructuras vacías de origen viral que no contienen un ácido nucleído; virus infectivos y no infectivos con estructura modificada química o biológicamente; y para identificar productos que se autoensamblan resultado de la clonación y expresión de genes estructurales en sistemas heterólogos (Noad & Roy, 2003; Fischlechner & Donath, 2007; Zeltins, 2013).

Con un enfoque biotecnológico se define a las VLPs como ensamblados macromoleculares de proteína incompetentes para replicarse, que consiste de una o varias proteínas estructurales de virus diferentes, que pueden ser obtenidos de organismos recombinantes vía la expresión de los correspondientes genes clonados (Pattenden et al., 2005). Esta última definición es acorde con el contenido de este escrito, sin embargo dependiendo del área de estudio en ocasiones se encontraran otras definiciones de VLP.

En comparación con los viriones nativos, las VLPs son estructuras más estables en condiciones de pH y temperatura extremos, además de resistir las variaciones en la composición de disolventes. Esta característica junto con la posibilidad de modificar selectivamente sus superficies, por técnicas de ADN recombinante o conjugación

química, ha ampliado el uso de las VLPs (Pease et al., 2009). En el campo de los nanomateriales se ha probado que las VLPs recombinantes pueden desplegar actividad de óxido-reducción, formar complejos orgometálicos que actúan como medios de conducción de electrones, además de asociarse en nanopartículas con metales, entre otros usos. En biomedicina, con las VLPs se han desarrollado vacunas recombinantes biocompatibles (virus de hepatitis B y virus del papiloma humano), vectores de transporte de ADN (nano-contenedores) y sistemas de detección o visualización (marcadores) (Dundr et al., 2002; Grgacic & Anderson, 2006; Fischlechner & Donath, 2007; Bachmann & Dyer, 2004). Todas estas aplicaciones han sido posibles a través de estudiar *in vitro* el ensamblado de VLPs.

Para la mayoría de las proteínas precursoras de cápsides el ensamblado *in vitro* (o reensamblado) es menos eficiente que en un compartimiento intracelular, debido a que requieren de proteínas que asisten el plegamiento y desensamblado de intermediarios mal plegados. Para cada proteína en particular, el ensamblado es espontáneo en soluciones acuosas sí la concentración es suficientemente alta y sí las condiciones de fuerza iónica, acidez (pH) y temperatura en la solución son las adecuadas (Harrison, 2001; Palucha et al., 2005; van der Schoot & Zandi, 2007; Pease et al., 2009).

Sin embargo es posible que durante la formación de VLPs se formen especies con diferentes grados de crecimiento incorrecto, asociado a concentraciones inusuales de iones o a cambios en la estequiometría de otros factores del ensamblaje (Sweeney et al., 2008). En ocasiones estas estructuras mal formadas se convierten en el tipo de ensamble dominante en condiciones de alta concentración de alguno de los componentes, aunque la cantidad de esta especie depende de parámetros como la energía de atracción de sitios de unión y de la flexibilidad geométrica de unión. No obstante, las estructuras fallan en el parámetro de unión sólo en el rango de concentraciones milimolares (Sweeney et al., 2008).

Otros estudios han demostrado que en ciertas condiciones algunas proteínas de cápside son capaces de asociarse de formas diferentes (Polimorfismo) para formar estructuras como son: micelas, láminas, discos, tubos, esferas y dímeros. La estabilidad de estas estructuras depende en gran medida del pH y la fuerza iónica, siendo el efecto del primero el cambiar el grado de ionización de los residuos de aminoácidos básicos y ácidos para definir parches de cargas en la molécula,

mientras que las interacciones electrostáticas son influenciadas por la fuerza iónica (Lavelle et al., 2009).

Finalmente una revisión reciente sobre la producción de VLPs destaca varios aspectos a considerar cuando se quiere utilizar las proteínas de cápside de virus para fines de aplicación biotecnológica o de investigación básica. Primero, se deben tener antecedentes de investigación del virus de interés; segundo, conocer el código de la proteína de cápside y de los péptidos funcionales obtenidos de alineamiento de oligonucleótidos; tercero, analizar si los péptidos foráneos pueden ser insertados en la molécula transportadora sin influenciar el autoensamblado; cuarto, establecer si las VLPs pueden ser obtenidas de hospederos heterólogos; y quinto, que las VLPs recombinantes construidas presenten ventajas significativas sobre los virus nativos, tales como su disponibilidad en cantidades ilimitadas y mejores propiedades funcionales (Zeltins, 2013).

1.2 ASAS SUPERFICIALES EN LAS PROTEÍNAS

Las asas de cadenas polipeptídicas conectan elementos de estructura secundaria, por tal motivo estos fragmentos desempeñan un papel importante en el plegamiento y en la estabilidad por lo que frecuentemente determinan la funcionalidad y especificidad de una proteína. Estas pueden situarse en el interior o el exterior de las proteínas estableciendo interacciones de estabilización en intercaras, o formando parte de sitios activos o de reconocimiento y unión a ligandos. Así también, su composición, longitud y número están determinados por el tipo de proteína en la que se encuentren (Tokuriki et al. 2008; Shehu & Kavraki, 2012)

Hasta el momento, las asas en la superficie de proteínas son difíciles de caracterizar dado que son flexibles, muy móviles y presentan una variabilidad estructural más amplia que las asas interiores (Shehu & Kavraki, 2012). Por lo general las asas expuestas al disolvente presentan una mayor proporción de residuos polares hidrofílicos y cargados, en comparación con la mayor cantidad de residuos hidrófobos del centro de la proteína (Ruvinsky & Vakser, 2010; White & Meirovitch, 2006).

Los residuos de las asas superficiales tienen una gran área superficial accesible al disolvente y, en comparación con los residuos que se encuentran en el centro de la

proteína, tienen pocos vecinos próximos de tal forma que tienen menos restricciones por lo que pueden experimentar grandes fluctuaciones estructurales (Ruvinsky & Vakser, 2010). Esta movilidad se debe al poco impedimento estérico entre residuos y a la composición de aminoácidos dentro de la secuencia, pues los residuos móviles como glicina y alanina tienen una masa efectiva pequeña que permite oscilaciones en sus centros de masa. En consecuencia, un fragmento peptídico con muchos residuos propensos a la movilidad previene la formación de un orden de gran longitud contribuyendo así a la aparición de estructuras secundarias irregulares como son las asas (Ruvinsky & Vakser, 2010).

A pesar de ser consideradas como estructuras irregulares, las asas pueden exhibir conformaciones estables dependiendo de las condiciones en las que se encuentren (pH o fuerza iónica), y de la función que desempeñen. En el caso de proteínas con desorden intrínseco o proteínas camaleónicas, la adopción de una conformación se da cuando hay una interacción con un ligando específico (Ruvinsky & Vakser, 2010; Shehu & Kavraki, 2012).

Para que un asa superficial pueda alcanzar una energía libre baja y así estabilizarse en una conformación determinada, deben permanecer constantes las interacciones electrostáticas (entre grupos polares) y la formación de puentes de hidrógeno entre residuos del centro de la misma asa. Sin embargo, la dinámica de interacción con moléculas del solvente propicia la adopción de múltiples conformaciones transitorias (Pokkuluri et al., 2002; White & Meirovitch, 2006; Hu et al., 2007).

La localización superficial de algunas asas las hace susceptibles de inserciones, deleciones y sustituciones de aminoácidos que podrían afectar la estabilidad de la proteína cuando se interrumpen puentes de hidrógeno o se promueve la exposición de residuos hidrófobos hacia la superficie. No obstante, estos cambios se dan paso a paso para poder ser tolerados y siempre que las cargas y tamaños de los residuos sean compatibles para preservar ciertas asas. En consecuencia, la probabilidad de eventos de inserción y deleción en las asas dependen fuertemente de los efectos de la constante evolución, la distancia evolutiva entre proteínas y de la adquisición de distintas funciones nuevas (Pokkuluri et al., 2002; Panchenko & Madej, 2005; Shehu & Kavraki, 2012).

La abundancia de regiones con segmentos cortos desordenados y regiones con flexibilidad conformacional permiten mantener interacciones específicas y a su vez permite a los virus evadir la unión de fármacos. Tal característica de las asas es aprovechada en las proteínas virales de cápsides donde, como estructuras flexibles, son importantes pues parecen tolerar (debido a un mecanismo de redundancia) una gran proporción de mutaciones (Tokuriki et al., 2008).

Aunque las asas superficiales no aportan mucho al mantenimiento de la estabilidad del centro de la proteína, si existe una tendencia a preservarlas en la estructura general (Panchenko & Madej, 2005). Por ejemplo en poliomavirus humano BK (BKV) las asas superficiales GH y HI presentan menos mutaciones, que las asas BC y EF (Tremolada et al., 2010). Por su parte las mutaciones en asas próximas al centro de la proteína, si pueden alterar de forma directa la capacidad de formar cápsides completas; al interrumpir la formación de puentes de hidrogeno que a su vez afectan la conformación de asas contiguas a hélices α ; como ocurre en la proteína de cápside de retrovirus en el que mutaciones puntuales en un asa localizada en la periferia de ejes de simetría y contigua a un hélice α , puede prevenir la formación de interacciones pentámero-hexámero estables, que son requeridas para forma una estructura cerrada. De esta manera parte de la estructura externa de la cápside puede ser modulada (Miyamoto et al., 2011; Auerbach et al., 2006).

1.3 PARVOVIRUS B19

El parvovirus B19 es un virus no envuelto que pertenece a la familia *Parvoviridae*, y se clasifica dentro del género *eritrovirus*, ya que presentan un alto tropismo por las células eritropoyéticas progenitoras (Kaufmann et al., 2004). Por lo general éste causa en los niños la conocida "quinta enfermedad", la cual es autolimitada y con sintomatología poco severa (eritema infeccioso). En otros casos, sin embargo, cuando se desarrolla una patología más severa se presentan alteraciones como artropatías persistentes, falla en la producción de células rojas y miocarditis o hepatitis (Kaufmann et al., 2004).

Como consecuencia de la ausencia de una capa lipídica y el limitado contenido de ADN, el parvovirus B19 es extremadamente resistente a la inactivación física, ya que

es termoestable a 56°C por 60 min, y los disolventes no lo afectan. Su inactivación se logra por formalina, propiolactona y radiación gamma (Heegaard & Brown, 2002).

Los viriones nativos presentan una cápside (T=1) con simetría icosaédrica, que se observan como estructuras casi esféricas (**Fig. 4**), cuyo diámetro oscila entre los 24 y 28 nm (280 Å). A diferencia de los demás miembros de su género, el exterior de la cápside del parvovirus B19 presenta espículas prominentes que sobresalen de la superficie externa de la cubierta de proteínas, y se ha reportado que tales proyecciones están involucradas en el reconocimiento y antigenicidad del hospedero (Kaufmann et al., 2008).

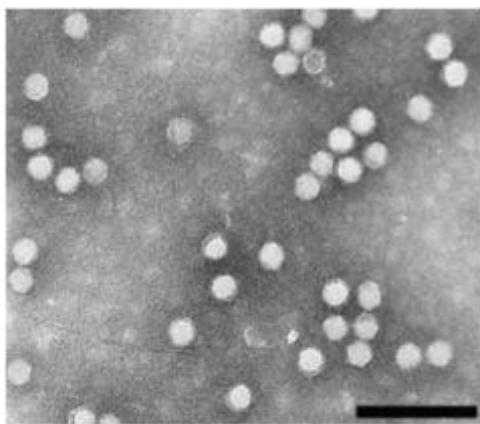


Fig. 4. Microscopía electrónica mostrando VLPs del parvovirus B19. Se observan estructuras icosaédricas, cuyo diámetro aproximado es de 23 nm. Escala de barra = 100 nm (Tomado de Ekman et al., 2007).

La función de esta cápside es contener y transportar una molécula de ADN de cadena simple de 5.6 Kb de longitud, en la que se encuentra codificada la información necesaria para producir los nuevos viriones (**Fig. 5**) (Kaufmann et al., 2008).

Para el autoensamble de la cápside del parvovirus B19 se requieren 60 subunidades de dos proteínas diferentes, VP1 y VP2, las cuales muestran un plegamiento idéntico en la región en que son idénticas. Alrededor del 96% del total de la cápside está constituida por monómeros de proteína VP2 mientras que la proteína VP1, su homóloga, representa sólo el 4% de la estructura (Heegaard & Brown, 2002).

Las proteínas VP1 y VP2 presentan un 100% de identidad, excepto por los 227 residuos adicionales que porta la proteína VP1, ya que en el genoma de parvovirus son codificadas por traslape de marcos de lectura (**Fig. 5**). La proteína VP2 es

codificada a partir de los nucleótidos 3125 a 4786 y tiene una masa molecular de 58 kDa; mientras que la proteína VP1 tiene 84 kDa y está codificada en la secuencia que va de los 2444 a los 4786 pb, estos nucleótidos adicionales se traducen en la región única de 227 residuos de aminoácido localizada en el extremo N-terminal de VP1. Esta región única presenta actividad de fosfolipasa tipo A-2 que es requerida durante la infección por este parvovirus. Datos experimentales indican que los epítomos neutralizantes de esta región son sólo expuestas en viriones nativos durante la unión a receptores (glucósido-esfingolípido e integrina $\alpha 5/\beta$), por exposición a calor o a pH bajo. En contraste, en las partículas tipo virus, la porción N-terminal de ambas proteínas se encuentra más accesible (Kaufmann et al., 2008).

En vivo, el ensamblado de algunos parvovirus puede proceder a través de un intermediario trimérico. En tanto la descapsidación puede involucrar acidificación en los endosomas, aunque la vía de desensamblado es poco clara aún (Carreira et al., 2004).

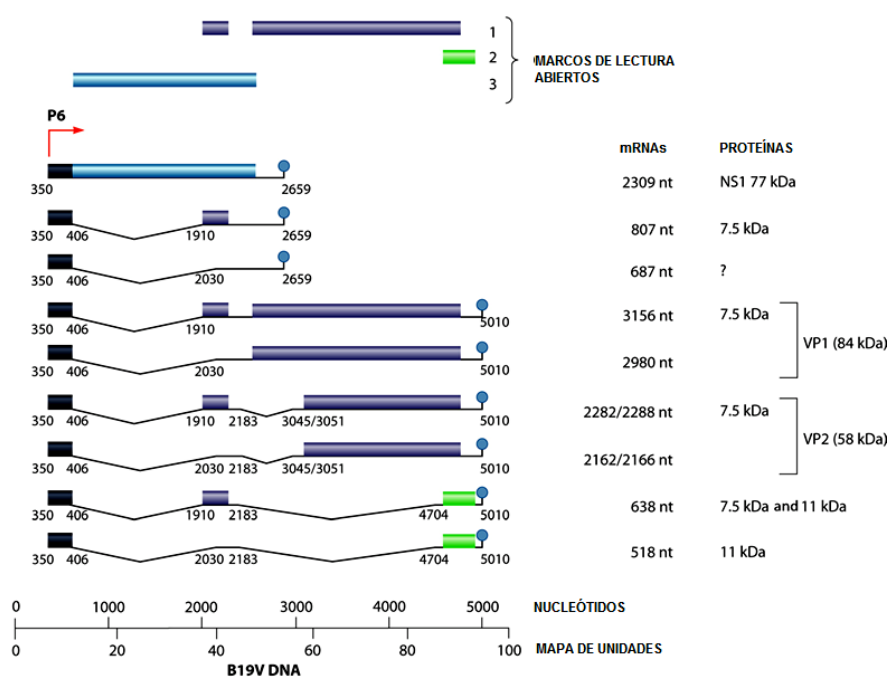


Fig. 5. Mapa de transcripción de los principales genes de parvovirus B19. Los transcritos de ARN están ordenados por longitud. Las barras indican marcos de lectura abierta. El genoma de parvovirus B19 contiene 5596 nucleótidos (nt) y presenta una secuencia de codificación interna de 4830 nt flanqueada por una secuencia terminal repetida de 383 nt. Las secuencias terminales son palíndromos y son capaces de formar configuraciones en asas dobles, sirviendo como cebadores para la síntesis de la cadena complementaria. Como en otros parvovirus animales, parvovirus B19 tiene dos marcos largos de lectura abierta, la proteína no estructural (NS1) codificada por los genes en el lado izquierdo del genoma y las dos proteínas de cápside (VP1 y VP2) por los genes del lado derecho. La transcripción produce hasta 9 transcritos superpuestos de ARNm, todos comenzando desde el sitio promotor P6 en el extremo izquierdo del genoma. Mientras otros parvovirus co-terminan especies de ARN en sitios poliadenilados en lo más lejano del sitio derecho, en B19 varios transcritos terminan en la mitad del genoma y usan una señal de poliadenilación inusual. Estos ARNs son derivados del lado izquierdo del genoma y forman un solo marco de lectura con NS1 (Tomado de Heegaard & Brown, 2002 y Servant-Delmas et al., 2010).

1.3.1 PROTEÍNA VIRAL 2 DE PARVOVIRUS B19: PARTÍCULAS TIPO VIRUS

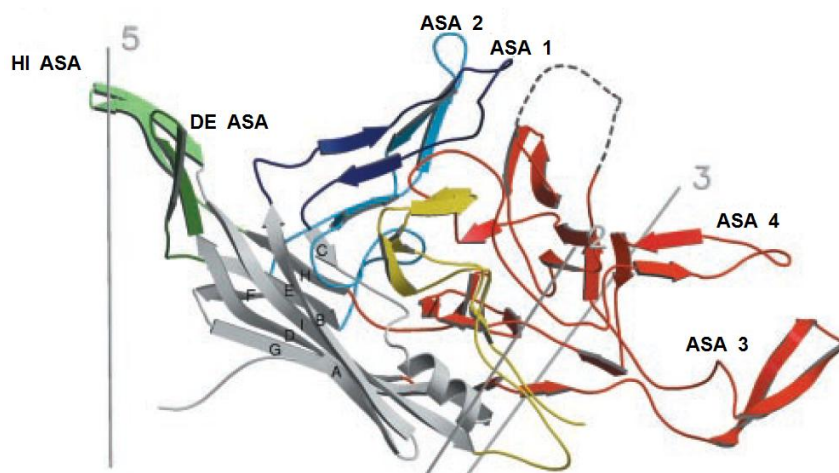
Desde hace varios años se ha observado que la proteína VP2, expresada en células de mamífero o insecto, puede asociarse en subunidades que se auto-ensamblan en ausencia de ADN viral o de la proteína VP1 para producir VLPs. Estas partículas son física y antigénicamente similares a los viriones nativos de parvovirus B19. Esto no ocurre con la proteína VP1 que cuando se expresa sola no forma espontáneamente VLPs (Wong et al., 1994).

Además se ha demostrado para varios parvovirus, que las VLPs presentan una morfología y antigenicidad similar con respecto a los viriones nativos, no así la respuesta neutralizante que parece depender de la conformación que induce la presencia de la proteína VP1 en los epítomos de la proteína VP2. No obstante varias regiones antigénicas han sido descritas solo para la proteína VP2, y entre ellas la primera mitad del extremo carboxilo-terminal posicionado alrededor del eje de orden 3 de la cápside (Kaufmann et al., 2008).

Varias propiedades de la superficie de la cápside de parvovirus B19 se han aclarado a partir de la resolución por cristalografía de rayos X (3.5 Å) de la estructura de la proteína VP2 (**Fig. 6**) en una solución de a pH 7.4, por parte del equipo de Kaufmann (Kaufmann et al, 2004). Debido a que el eje de rotación más grande se desplazó, este casi correspondió con el orden 3 cristalográfico, esto produce un desorden de rotación que probablemente es la causa de un difuminado anisotrópico que se observa en el mapa de densidad electrónica. No obstante este grupo para obtener un modelo más completo y refinado utilizó la estructura de la proteína de cápside de dos virus relacionados: virus adeno-asociado 2 (AAV-2) y el virus de la panleucopenia felina (FPV) (**Fig. 7**) (Kaufmann et al., 2004).

Aunque VP2 de parvovirus B19 tiene solo 26% de similitud en secuencia con VP3 de AAV-2, en el alineamiento estructural hasta un 72% de los átomos de carbonos- α ($C\alpha$) se superponen con una RMSD (desviación del valor cuadrático medio) de 1.8 Å; además una mayor desviación se presenta al alinear una inserción entre las hebras G y H del barril β entre 168 de átomos $C\alpha$ (RMSD de 2.0 Å) (Kaufmann et al., 2004).

a)



b)

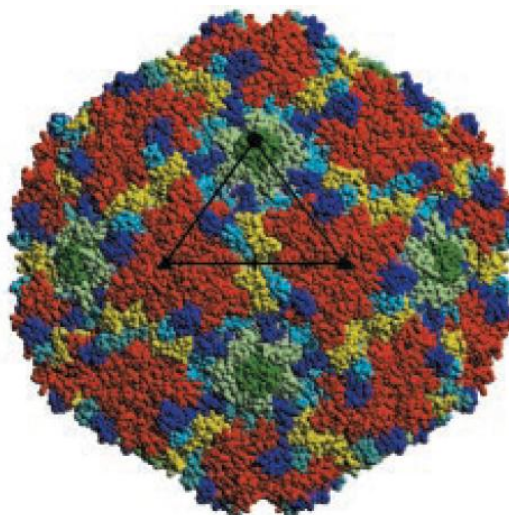


Fig. 6. Estructura secundaria de la proteína VP2 y VLP de parvovirus B19. a) Diagrama de listón de la proteína VP2 de parvovirus B19 donde se destacan de las secuencias consenso de diversas estructuras secundarias identificadas en un alineamiento estructural con la correspondiente proteína de cápside del virus adeno-asociado 2 (AAV-2), del virus de la panleucopenia felina (FPV) y otros virus relacionados. El barril β tiene dos giros, cuatro asas principales (extensiones) y 8 hebras- β antiparalelas (A a I). A lo largo de la cadena de polipéptido, las hojas se identifican por el arreglo de las cadenas BIDG y CHEF. Las cadenas del barril β (gris) están marcadas consecutivamente de A a la I: β A (aminoácidos (aa) 28 al 33 aa), β B (aa 34-46), β C (aa 88-94), β D (aa 112-128), β E (aa 149-153), β F (aa 219-222), β G (aa 228-233), β H (aa 456-459) y β I (aa 480-495). En color gris también se destacan: hélice α A (aa 95-110), hélice α B (aa 214-216); y las secuencias consideradas como conservadas: aa 160-177, aa 182-194, aa 206-216, aa 246-257, aa 511-524, y aa 534-543. Las asas se nombran por las dos letras de las hebras que conectan y otras por un número que se incrementa según la proximidad con el extremo C-terminal. Otras estructuras pueden estar marcadas con la letra ó número de la hebra contigua. Las asas-extensiones que conectan las cadenas del barril β están identificadas por los siguientes colores: azul oscuro, **asa BC** (aa 47-87); verde oscuro, **asa DE** (aa 129-148); azul claro, **asa EF** (aa 154-218); rojo, **asa GH** (aa 234-455); verde claro, **asa HI** (aa 460-479); y en amarillo, aminoácidos del extremo C-terminal (496-554). Dentro de estas extensiones se distinguen con números las asas superficiales: **asa 1** (aa 59-77), **asa 2** (aa 190-207), **asa 3** (aa 258-266), **asa 4** (383-404), **asa GH 1** (aa 296-328), y **asa GH 2** (355-362). El asa desordenada formada por los residuos 300 a 314 aa, ha sido omitida debido a que sus coordenadas atómicas no pudieron ser resueltas, su posición se representa como una línea punteada, que fue modelada a partir de un asa estructuralmente equivalente del AAV-2. b) Topografía de la superficie del parvovirus B19. Las asas superficiales en los incisos a y b están codificadas por colores de acuerdo al diagrama de listón, previamente descrito. En el vértice superior del triángulo se localiza el eje orden 5 (pentágono), en los vértices inferiores el eje de orden 3 (triángulo) y en la mitad de la base está indicado el eje de orden 2 (óvalo) (Modificado de Kerr et al, 2006 y Kaufmann et al., 2004).

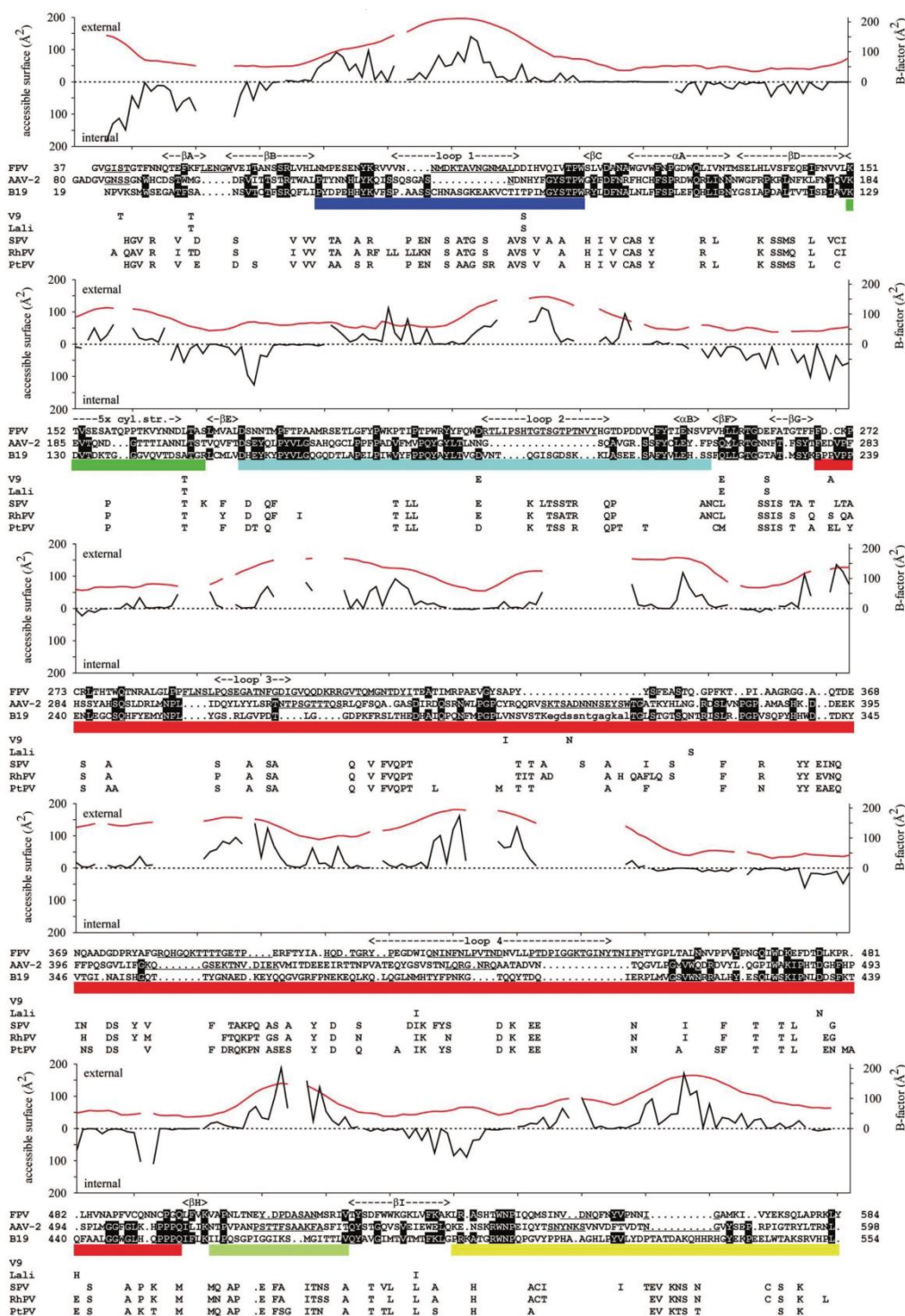


Fig. 7. Alineamiento estructural de la proteína VP2 de parvovirus B19 con las proteínas de cápside de FPV (PDB 1C8F), AAV-2 (PDB 1LP3), y otros virus relacionados. Los elementos de estructura secundaria de FPV son marcados sobre la secuencia de alineamiento. Residuos idénticos alineados están en blanco con un fondo negro, los puntos continuos indican espacios introducidos para un mejor alineamiento que reemplazan a residuos que no existen en la secuencia original. Residuos de AAV-2 o FPV que podrían no ser estructuralmente equivalentes a B19 están subrayados. Las barras debajo de las secuencias alineadas resaltan las asas superficiales y el código de colores es el mismo que se describió para la figura 6: azul oscuro, asa BC; verde oscuro, asa DE; azul claro, asa EF; rojo, asa GH; verde claro, asa HI; amarillo, aminoácidos del extremo C-terminal. Sobre la secuencia alineada está trazada el área accesible a superficie externa e interna (negro) de la cápside. Se muestra también el promedio del factor de temperatura para cada residuo (rojo). Adicionalmente los aminoácidos que no son idénticos a la secuencia de VP2 de B19 son mostrados para las proteínas de cápside de eritrovirus de primates no humanos SPV, RhPV, y PtPV; y de eritrovirus humano LaLi y V9 (Kaufmann et al., 2004).

La proteína VP2 tiene una estructura de barril- β antiparalelo de ocho hebras, las cuales se unen a través de cuatro extensiones (asas). Estas hebras a lo largo de la cadena del polipéptido, se nombran con las letras del alfabeto de A a la I, iniciando desde el extremo amino-terminal. Las hebras- β antiparalelas se disponen en topología de "jelly roll", de tal manera que se reconocen dos arreglos: BIDG y CHEF (**Fig. 6a**). Estos forman las dos hojas del sándwich que es la base del barril- β , que presenta las secuencias más conservadas entre los parvovirus (Kaufmann et al., 2004).

El ensamblado entre los barriles β forma la cápside mientras las inserciones forman la superficie (dos terceras partes de la estructura total) (Agbandje- McKenna et al., 1998; Kaufmann et al., 2004). Las particularidades de la proteína VP2 de parvovirus B19 en comparación con otros parvovirus, radican en la extensión de las largas inserciones que conectan las hebras del barril- β , que forman la mayoría de los contactos entre subunidades y definen la superficie externa, en la que se presentan los receptores de sitios de anclaje y determinantes inmunológicos (Kaufmann et al., 2008; Abrescia et al., 2012).

La estructura de la VLP parece estar estabilizada por los enlaces, uno sobre otro, que las moléculas contiguas de VP2 establecen entre sí; formando un entramado donde el asa 3 y 4 del segmento GH de una subunidad son acercados en una especie de entretejido, con el asa 1 del segmento BC y una parte del segmento GH de una subunidad simétricamente relacionada del eje 3 (Kaufmann et al., 2004).

La porción N-terminal de la proteína VP2 (19 aa) está frecuentemente localizada en el interior de la cápside cerca del eje de orden 5, suele tener un carácter básico. Mientras que los residuos (50 aa) que forman el extremo C-terminal son externalizados en la estructura viral (Kaufmann et al., 2004).

El área alrededor del eje de orden 3 es formada por un asa entre las hebras β G y β H (aa 235-454) y sus equivalentes simétricos relacionados. La base de este eje es compuesta de la parte C-terminal del segmento GH (aa 410-454), que en su mayor parte esta conservada entre los parvovirus (Kaufmann et al., 2004).

En esta estructura es posible reconocer elementos comunes a otros parvovirus como son la formación de un poro tipo cañón, rodeando la estructura β -cilíndrica en la

región del eje de simetría 5 (conecta el interior con el exterior) con una zona de depresión alrededor del mismo; igualmente encontramos salientes o protuberancias alrededor del eje de simetría 3 y una depresión en cada eje de simetría 2 (Hueffer & Parrish, 2003; Kaufmann et al., 2008).

Sin embargo en la superficie de la cápside de parvovirus B19 las protuberancias o picos alrededor del eje de orden 3 son pequeñas en comparación con AAV-2 y FPV, aunque la posición es la misma. Esta falta de picos, en comparación con AAV-2, es consecuencia de un acortamiento de las asas 3 (aa 249-284) y 4 (aa 388-403) de una subunidad que se intercalan en el segmento GH (aa 296-328) de otra molécula simétricamente relacionada. Otra diferencia destacable son las depresiones alrededor del eje de orden 3, debido a una pérdida o acortamiento de un sub-asa en el asa 4, que en FPV (aa 433-448) forma un pico superficial (Kaufmann et al., 2004).

La estructura cilíndrica en el eje de orden 5 se forma por el segmento DE (aa 129-148) y relacionados equivalentes simétricos. Esta estructura es homóloga a la de AAV-2 y FPV, pero en parvovirus B19 la punta del asa se inclina hacia el eje central del canal. El acceso a este canal está regulado por las interacciones entre treoninas simétricamente equivalentes, que entran en el canal formando una entrada de solo 10 Å de diámetro, que mantiene cerrada la superficie viral exterior. Sin embargo, la presencia de los residuos de glicina (aa 136-138) después de los residuos que bloquean la entrada, podrían proporcionar flexibilidad estructural para cambiar el canal de cerrado a abierto en presencia de la proteína VP1 ó ADN durante la entrada a la célula, posiblemente para permitir la externalización del extremo amino-terminal de VP1 (Kaufmann et al 2004; Kaufmann et al, 2008).

El segmento HI (aa 460-480) extiende la estructura de orden 5 para formar un motivo tipo flor con la estructura cilíndrica en su centro. A su vez este motivo es rodeado por una depresión tipo cañón, cuyo borde externo es más prominente que en AAV-2 y FPV. Esta depresión está compuesta por el asa 1 (aa 59-77), el asa 2 (aa 190-207), un sub-asa del segmento GH (aa 355-362) y una inserción de 10 aminoácidos (aa 525-536), única para eritrovirus, en el asa que comprende los aminoácidos 512-543. Esta última inserción forma la cresta de la pared entre la depresión del eje de orden 2 y el cañón (Kaufmann et al., 2004). En este eje también se localizan secuencias de gran similitud (aa 160-177, 182-194, 206-216, 246-257, 511-524 y 534-543), entre eritrovirus. En particular, entre parvovirus B19 y AAV-2, las coincidencias se dan en

aminoácidos externos de la cadena cercana al asa 1 (aa 82-87) y el extremo aminoterminal del asa 2 (aa 168-188). La presencia de estas asas de superficie conservadas puede indicar la localización de sitios homólogos de unión de coreceptores (Kaufmann et al., 2004).

Las diferencias sutiles en el eje de simetría 3 en los parvovirus son importantes en el control del tropismo celular, además de generar sitios de importancia antigénica. En el caso de las regiones del eje de simetría de orden 5, además de intervenir en la unión a receptores, forman el poro por el cual el extremo amino terminal de la proteína VP1 es expuesto al medio (Hueffer & Parrish, 2003). Estas diferencias entre las estructuras se deben a que las asas que conectan las hebras β son diferentes entre los géneros de parvovirus y no están completamente conservadas en respuesta a las propiedades de antigenicidad y asociación con receptores celulares particulares (Johnson, 1996; Kerr et al., 2006).

En un estudio complementario se aislaron viriones silvestres y cápsides vacías de muestras de suero humano, que se analizaron por microscopía crioelectrónica a una resolución de 7.5 y 11.3 Å de resolución, para definir las diferencias con respecto a las VLPs formadas sólo con proteína VP2. De esta manera se determinó como la presencia de la proteína VP1 y el ADN influyen en la estructura de cápsides de parvovirus B19 (Kaufmann et al., 2008).

En los viriones nativos la densidad es mayor en la superficie alrededor del eje de orden 5 y en la base de esta ya que el genoma viral se concentra internamente. Es de destacar que la presencia de la proteína VP1 y/o ADN afecta la posición espacial de la porción terminal de VP2 dentro de la partícula del virus (Ros et al., 2006; Kaufmann et al., 2008). El genoma en uno de los ejes de orden 5, altera la densidad cerca de la superficie externa que es diferente a la de las VLPs. El péptido N-terminal de VP2 es posicionado entre las subunidades vecinas de VP2 en los viriones nativos y es expuesto en la superficie adyacente al cilindro del eje de orden 5. La región única de VP1 (VP1u) está fuera de la cápside, aunque también algunas partes pueden estar de forma interna e inaccesible (Kaufmann et al., 2008).

Las cápside vacías que probablemente son productos de la degradación de viriones completos, precursores de partículas completas o remanentes de intermediarios inestables (Kaufmann et al., 2008); presentan una densidad positiva en la base del

canal del eje de orden 5, lo que sugiere que la secuencia terminal de VP2 entra en la base interna abriendo el canal. Para los viriones nativos y cápsides vacías no se pudo localizar la densidad de la región única de VP1 (VP1u), posiblemente porque no entra en la simetría icosaédrica, está desordenada o la señal fue mínima por el número bajo de copias (Kaufmann et al., 2008). En las VLPs se detecta una densidad negativa cercana al eje de orden 5, que coincide con la pérdida de los residuos amino-terminal en la estructura del cristal (Kaufmann et al., 2008).

Finalmente, los viriones maduros tienen un peso molecular de 5.6×10^9 y una densidad en un gradiente de cloruro de cesio de $1,29 \text{ g/cm}^3$ (Kaufmann et al., 2004; Kaufmann et al., 2008).

1.3.2 QUIMERAS DE PARTÍCULAS TIPO VIRUS DE PARVOVIRUS B19

Dada la característica de las VLPs de ser estructuras de multiproteínas que imitan la organización y conformación de auténticos virus nativos, éstas se han considerado como posibles candidatos para producir vacunas. Una de las ventajas que proveen hace referencia al requerimiento de bajas cantidades de antígeno, en comparación contra el uso de subunidades individuales, para producir una respuesta protectora. Esta antigenicidad de las VLPs ha sido previamente documentada, destacando que es debida a la interacción y activación de células dendríticas (DCs) y células del linaje mieloide (Mellado et al., 2009).

Como antecedentes del uso de VLPs de parvovirus B19, destaca la producción en sistema de baculovirus de VLPs quiméricas modificadas en el extremo amino-terminal de la proteína VP2 y en una de sus asas superficiales (residuo 293; segmento GH). Los epítomos que se incorporaron a la VP2 provinieron del virus de herpes simple humano (HSV-1), y del virus de la hepatitis murina (MHV). Tanto las VLPs modificadas en el extremo amino como en el asa, produjeron una respuesta y protección contra el reto viral (Brown et al., 1994). También ha sido posible obtener VLPs quiméricas recombinantes que transportan epítomos específicos del virus dengue 2 (Proteína E, Dominio III: 352-368 y 386-397), en el extremo amino-terminal de la proteína VP2. Y en otro estudio se obtuvieron VLPs que portaban epítomos del virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), en este caso se reportó que estas

partículas, administradas por vía intranasal, inducen una respuesta de células T citotóxicas y anticuerpos IgG e IgA (Sedlik et al., 1999; Amexis & Young, 2006).

1.4 VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO HUMANO

El virus sincicial respiratorio humano (VSR) es una causa importante de infecciones graves del tracto respiratorio inferior en niños pequeños, adultos mayores y en personas inmunocomprometidas. Al respecto se ha estimado que en todo el mundo se presentan más de 64 millones de casos de infecciones por VSR y aproximadamente 12,000 muertes cada año por complicaciones respiratorias, a su vez se ha asociado la presencia del virus con el surgimiento de epidemias de bronquiolitis y neumonías. Sumado a estos hechos, las personas pueden infectarse repetidamente por el VSR a lo largo de toda su vida, favoreciendo la transmisión y permanencia del virus (Tripp, 2004; McLellan et al., 2010; Graham, 2010).

El VSR es un virus envuelto, cuyo genoma es de ARN de hebra sencilla de sentido negativo. Está clasificado dentro de la familia *Paramixoviridae*, género *Pneumovirus*. Otros virus patógenos humanos que destacan en esta familia son, rubéola, sarampión y el virus de la parainfluenza (McLellan et al., 2010).

Morfológicamente los viriones de VRS se describen como pleomórficos y de tamaño relativamente grande, sus dimensiones varían entre 150 y 300 nm de ancho y entre 1000 y 10000 nm de longitud. En la superficie de su envoltura lipídica sobresalen espículas formadas por las proteínas transmembranales de anclaje (G), de fusión (F) y, por una proteína pequeña hidrofóbica (SH) que forma proyecciones de 11 a 20 nm de largo que están separadas cada 6 a 10 nm (**Fig. 8**) (McLellan et al., 2010; ICTVdB, 2010). Múltiples copias de la proteína N forman la nucleocápside, la cual tiene una forma filamentosa de 600 a 800 nm de longitud y de 12 a 15 nm de ancho que protege un complejo ribonucleoproteínico (ICTVdB, 2010).

El genoma del VSR (15300 nucleótidos) tiene 10 genes que codifican para 11 proteínas virales, de las cuales las proteínas F (fusión), G (adhesión) y SH (hidrofóbica pequeña) están expuestas sobre la superficie del virión y en las membranas de células infectadas, siendo las dos primeras los principales blanco de la inmunidad (Smith et al., 2002).

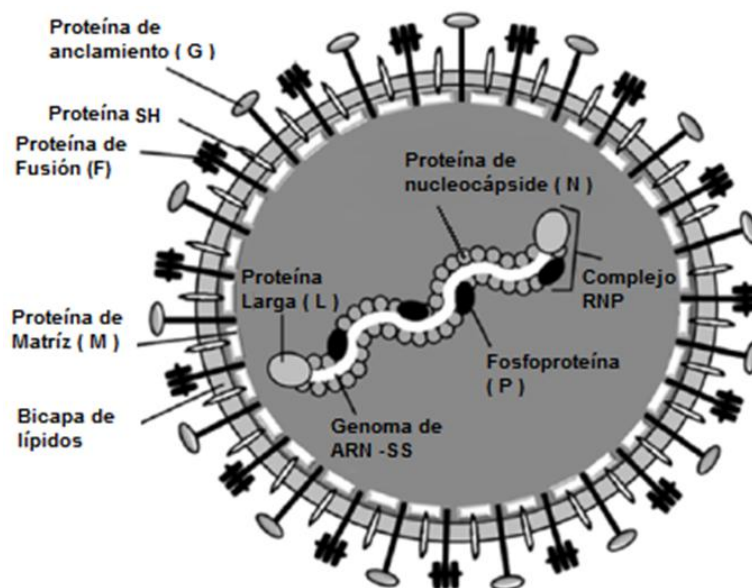


Fig.8. Estructura del VSR humano. Este complejo está formado por el genoma viral asociado a la ARN polimerasa dependiente de ARN, compuesta de una fosfoproteína (P), una polimerasa grande (L) y proteínas M2-1. También, aunque en pequeñas cantidades, en el virión son transportadas 3 proteínas virales M2-2 y dos proteínas no estructurales NS1 y NS2, relacionadas con la regulación de la síntesis de ARN y con la inmunidad innata del hospedero (McLellan et al., 2007). En tanto que la conexión entre la envoltura y la nucleocápside se da a través de una proteína de matriz (M), esta posiblemente inhibe y redirige algunos procesos de transcripción de la célula hospedera (Smith et al., 2002; Vergara et al., 2006). Las proteínas que se han evaluado como blancos potenciales para la terapia anti-VSR son las proteínas F y G de la superficie, y las proteínas del complejo de la polimerasa N, P y L que son requeridas para la replicación del virus (Modificado de Empey et al., 2010).

1.4.1 PROTEÍNA F DEL VIRUS SINCICIAL RESPIRATORIO HUMANO: REGIONES ANTIGÉNICAS

La glicoproteína F del VSR es una proteína de fusión viral tipo I, clasificación dentro de la cual también se encuentran la hemaglutinina del virus de la influenza y la envoltura del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1) (McLellan et al., 2011). Por su posición en el virión, esta proteína es un blanco principal de anticuerpos neutralizantes (Martín et al., 2006).

In vitro, en ausencia de la proteína G (de unión a membrana), se ha descrito que la proteína F en cultivos de células inmortalizadas promueve la unión de célula con célula (sincicios) a través de la fusión de membranas (Martín et al., 2006; Munday et al., 2010). Para que este proceso sea favorecido, la proteína F adopta una diversidad conformacional en la que destacan dos estados principales, los cuales presentan diferentes energías de plegamiento: un estado metaestable (prefusión) adoptado antes de la interacción virus-célula y, un estado de postfusión que es estable y que

se presenta después de fusionar las membranas del virus y la célula (Zhao et al, 2000; Swanson et al., 2011; McLellan et al., 2011; McLellan et al., 2013).

Se han descrito dos morfologías para la proteína F; en el estado de prefusión ha sido observada una forma de paleta (lollipop), mientras que para el estado de postfusión la forma es de muleta (crutch) (Swanson et al., 2011). En el estado de postfusión también se ha observado la agrupación de la proteína en rosetas, ya que la agregación se debe a la exposición del péptido de fusión (137-145 aa de F) (Chaiwatpongsakorn et al., 2011).

En el estado metaestable (prefusión) de la proteína F, el péptido de fusión se localiza en el interior de la cavidad del trímero (McLellan et al., 2013). En el extremo N-terminal, una secuencia de repetición heptamérica con residuos hidrófobos denominada HRA se empaquetan fuera de la punta globular, haciendo una contribución significativa a la superficie de la proteína (Swanson et al., 2011). Mientras en el extremo C-terminal, otra secuencia con hepta repeticiones denominada HRB, forma un tallo en serpentín (coiled-coil). En el trímero de postfusión, la conformación de estas regiones cambia, en el caso de las hélices de HRB estas se empaquetan contra la hélice larga en serpentín de HRA, enterrándose en el centro de una envoltura de 6 hélices (Swanson et al., 2011; McLellan et al., 2011).

La proteína F en el estado de prefusión es blanco de anticuerpos neutralizantes que son producidos durante la infección natural del VSR. En esta conformación en el trímero se localiza en el ápice distal a la región de transmembrana, un sitio metaestable denominado sitio antigénico Ø (cero) (**Fig. 9a**); que es reconocido por los anticuerpos 5C4, AM22 y D25, que son más efectivos para neutralizar el virus que el anticuerpo comercial Palivizumab, el cual se une al estado de postfusión. Este sitio es muy móvil con respecto a la estructura general de la proteína F, sin embargo al unirse con el anticuerpo D25 se estabiliza (McLellan et al., 2013).

La glicoproteína F en el estado de postfusión, está compuesta de tres subunidades estrechamente entrelazadas que forman una punta globular y un tallo alargado. Cada subunidad tiene tres dominios, designados como I, II y III. Los dos primeros se encuentran en la parte superior de la punta del trímero formando una cima triangular, siendo el dominio II la base de la punta. En tanto que la secuencia HRA, que es una prolongación del dominio III, se introduce en el centro de la estructura. Mientras que

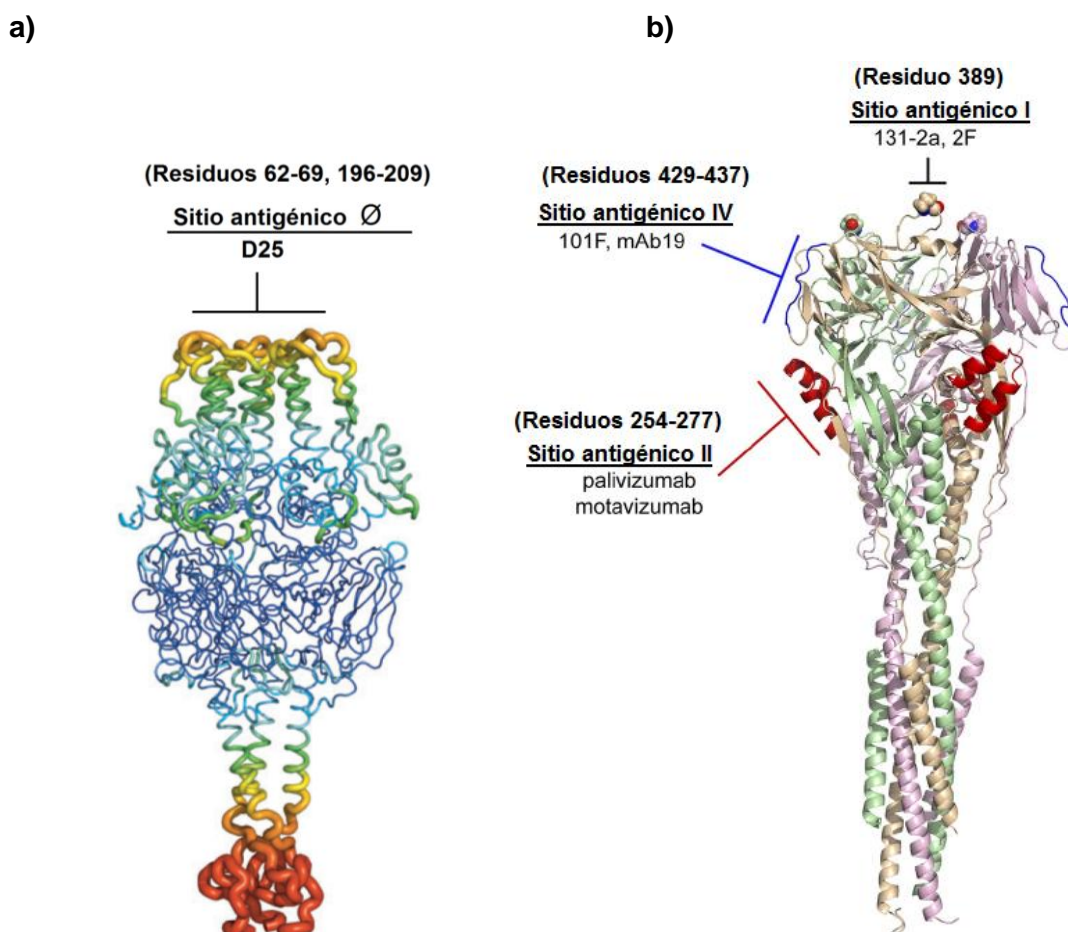
la hélice HRB está atada al dominio II y se extiende hacia abajo hasta el final de la punta distal del tallo, donde este forma la vuelta exterior de un empaquetado de seis hélices con la parte interna de la vuelta en serpentín trimérica de HRA (Martín et al., 2006; Swanson et al., 2011).

El precursor de cada monómero es una sola cadena polipeptídica N-glicosilada (F0), de 574 aminoácidos, que es ensamblada en el retículo endoplásmico como un homooligómero y después es cortada en dos sitios por acción de una proteasa celular, tipo furina, en dos cadenas, F1 (47 kDa) y F2 (20 kDa) (Blanco et al., 2010). El más corto de ellos, el fragmento N-terminal (F2) está unido covalentemente por dos enlaces disulfuro al fragmento C-terminal de mayor longitud (F1) (McLellan et al., 2011). Tres regiones hidrofóbicas principales destacan en la proteína F, una en el extremo N-terminal, el cual actúa como una secuencia señal para la translocación en el retículo endoplásmico, otra región que es el ancla de membrana cerca del extremo C-terminal, y una tercera región en el extremo N-terminal de la cadena F1, que es el péptido de fusión (Martín et al., 2006; Chaiwatpongsakorn et al., 2011).

El polipéptido procesado está anclado en la membrana celular por el segmento transmembranal localizado en el extremo C-terminal de F1 (residuos 389 a 414), en tanto que en el extremo N-terminal se expone un péptido señal con dominios fuertemente hidrofóbicos de aproximadamente 20 residuos (Smith et al., 2002; Vergara et al., 2006). La tercera parte del extremo amino terminal de la cadena F1 es parcialmente resistente a la acción de proteasas, y presenta en esta región varias hélices α , incluyendo a HRA. En seguida de la región helicoidal, se encuentra una región de hebras β que contiene 11 residuos de cisteínas próximos entre sí. Mientras en la región transmembranal del extremo C terminal de F1 se encuentra la otra secuencia heptamérica, HRB. Estas secuencia con hepta repeticiones se localizan adyacentes al péptido de fusión (N-terminal hacia HRA) y a la región transmembranal (C-terminal hacia HRB) de cada monómero del homotrímero (Martín et al., 2006). Tanto el péptido de fusión como la región transmembranal se localizan en la parte baja del tallo del trímero y podrían sobreponerse para insertarse dentro de la membrana celular (Swanson et al., 2011).

En el estado de postfusión de la proteína F, a partir de los ensayos de reconocimiento por anticuerpos monoclonales neutralizantes de la unión a péptidos sintéticos o por secuenciación de mutantes que no se unen a anticuerpos

neutralizantes, se han identificado sitios o epítomos que son altamente inmunogénicos. En general, se reconocen dos grandes regiones antigénicas en la porción F1, una antes de la región rica en cisteínas (sitio II) y la otra cercana al extremo C-terminal de las cisteínas (sitios IV, V y VI) (Calder et al., 2000). Estos sitios inmunogénicos han sido mapeados en la estructura primaria de la proteína, y corresponden a las regiones denominadas II, IV, V y VI, comprendidas por los aminoácidos 104 a 389, 215 a 234, 255 a 275 y 429 a 447, respectivamente (**Fig. 9b**) (Smith et al., 2002; McLellan et al., 2011).



El epítipo del anticuerpo motavizumab es más complejo (epítipo cuaternario) e involucra hasta dos protómeros (McLellan et al., 2011).

Para algunos anticuerpos monoclonales producidos contra las proteínas F y G, se ha reportado una actividad neutralizante de la infección, así como inhibición de la fusión de membranas *in vitro* y protección *in vivo* (Calder et al., 2000). Por este motivo actualmente se han desarrollado varias vacunas contra la glicoproteína F, ya que exhibe menor variación antigénica que la proteína G (Bembridge et al., 2000; Kim et al., 2010).

Debido a la importancia que representan las infecciones por el VSR y en gran medida a la dificultad por desarrollar una vacuna para evitar la infección viral, una de las opciones más prometedoras para generar de forma segura una respuesta inmune protectora es la generación de anticuerpos neutralizantes contra el VSR. En este proyecto proponemos el ensamblado *in vitro* de VLPs quiméricas que transporten en un asa superficial parte de la proteína F del VSR. Estudiaremos la competencia de estas quimeras para formar VLPs y la estabilidad de las mismas, además evaluaremos su potencial como agente presentador de antígenos heterólogos.

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El parvovirus B19 es un virus de forma icosaédrica cuya cápside está formada por 60 subunidades de proteína. Aproximadamente el 95% de la cápside está conformada por repeticiones de la proteína denominada VP2 (58 kDa), mientras el 5% restante lo conforma la proteína denominada VP1 (83 kDa). La secuencia de ambas proteínas es casi idéntica, excepto por que la proteína VP1 presenta una región única adicional, de 228 residuos de aminoácido en su extremo amino terminal.

Aunque ambas proteínas pueden formar parte de la cápside, se ha demostrado que la proteína VP2, en ausencia de la VP1 y del genoma del virus, es capaz de formar capsómeros capaces de ensamblarse en cápsides no infectivas llamadas "partículas tipo virus", las cuales son similares en morfología, estabilidad y antigenicidad a los viriones nativos. Por su parte, la proteína VP1 es incapaz de formar VLPs por sí sola. Sin embargo se ha demostrado que esta proteína se puede incorporar a las VLPs en presencia de VP2.

La capacidad de autoensamblado de las proteínas virales ha sido aprovechada para utilizar estas VLPs como presentadores de antígenos. Esto ha sido posible mediante ingeniería de proteínas, al fusionar secuencias codificantes al extremo 5' del gen VP2. Esto produce quimeras de VP2 con el extremo N-terminal modificado. El extremo N-terminal de VP2 y VP1 está naturalmente expuesto en la superficie de la cara externa de la cápside y no interviene ni en la unión entre subunidades para formar capsómeros ni en el ensamble de capsómeros para formar cápsides. Aunque es posible que en ausencia de VP2, el extremo N-terminal de VP1 sea el responsable de la incapacidad de esta proteína de formar cápsides por impedimento estérico.

Además del extremo N-terminal de la proteína VP1, sobre la superficie de la cápside se encuentran expuestas varias asas que forman parte de la estructura natural del virus. Algunas de estas asas están estrechamente involucradas en la estabilidad de la estructura ensamblada, mientras que otras asas establecen interacciones débiles con residuos de aminoácidos vecinos. Es razonable que cualquier modificación en las asas superficiales que se encuentran entre contactos de subunidades resulten en la desestabilización de la estructura supramolecular. Sin embargo, las asas que no presenten contactos con otros residuos probablemente permiten una inserción de aminoácidos sin impactar negativamente la expresión y el ensamblado de las VLPs.

Estas asas modificables podrían ser usadas para la presentación de antígenos que por otros motivos no puedan ser presentados en el extremo N-terminal de la VP2.

Para estudiar el efecto que produce la modificación de las asas superficiales de la VP2 en la formación de VLPs, se seleccionaron asas superficiales cuya estructura y contactos sugirieron no ser críticas para el ensamble de las VLPs. Estas asas se modificaron mediante la inserción de fragmentos de la proteína F del virus sincicial respiratorio. Específicamente se determinó si la inserción de una región de aminoácidos (que posiblemente se pliegan en el espacio), interfiere en el proceso de ensamblado y estabilización de las VLPs de parvovirus B19.

3 JUSTIFICACIÓN

Las cápsides virales son estructuras cuyo diseño les permite llevar a cabo varias funciones, como protección, transporte, reconocimiento e invasión celular. Todas estas capacidades derivan en gran parte por el orden supramolecular del ensamblado que le permiten ser una entidad simétrica de gran tamaño, con grupos químicos distribuidos de forma específica en la superficie.

Las VLPs, son estructuras similares a las cápsides virales nativas; sin embargo, se diferencian de estas pues no transportan un genoma que les permita replicarse dentro de una célula. Esta capacidad infectiva suprimida ha posibilitado la utilización de las VLPs con diversos fines. Se han desarrollado metodologías en donde se aprovecha la simetría de las subunidades para construir nanopartículas con propiedades semiconductoras. Otra utilidad de las VLPs que se ha implementado es el diseño de plataformas para sondas fluorescentes para visualizar tejidos en organismos vivos con fines de diagnóstico; además el encapsulado de péptidos y plásmidos en VLPs puede ser utilizado en terapia génica y vacunación.

Particularmente las VLPs del parvovirus B19 han sido utilizadas como vehículos de transporte y presentación de diversas moléculas con propiedades inmunogénicas. Para tal fin, utilizando técnicas de ingeniería genética, las secuencias de ambas proteínas de la cápside VP2 y VP1 han sido objeto de modificación.

Al respecto se ha observado que las modificaciones en el extremo N-terminal de estas proteínas no afecta su plegamiento ni su capacidad para establecer contactos entre subunidades, los cuales son pasos fundamentales para el posterior ensamblado de la cápside. En cuanto a los posibles efectos de la modificación de las asas en el ensamblado de VLPs del parvovirus B19, poco se conoce. Por lo que definir experimentalmente cuáles asas superficiales de la proteína VP2 toleran ser modificadas en su extensión sin eliminar su capacidad de autoensamble, aportará datos sobre los sitios más probables en los que se podrán anclar diversas moléculas, incluyendo epítomos inmunogénicos.

4 HIPÓTESIS

Se ha reconocido que las asas superficiales son sitios que naturalmente permiten cambios, como deleciones o inserciones, ya que estas estructuras son más largas o cortas entre diferentes virus evolutivamente relacionados. Esto indica que estas estructuras podrían permitir modificaciones en sus secuencias sin impedir su capacidad de formar cápsides. Por lo tanto, sí se realiza la inserción de un péptido en una sección correspondiente a un asa superficial de la proteína VP2 que no forme parte de los contactos que directamente estabilizan la cápside, es posible obtener el ensamblado de VLPs quiméricas, con el péptido heterólogo expuesto en la superficie. Así que, este péptido expuesto puede entonces funcionar como antígeno y ser inmunogénico.

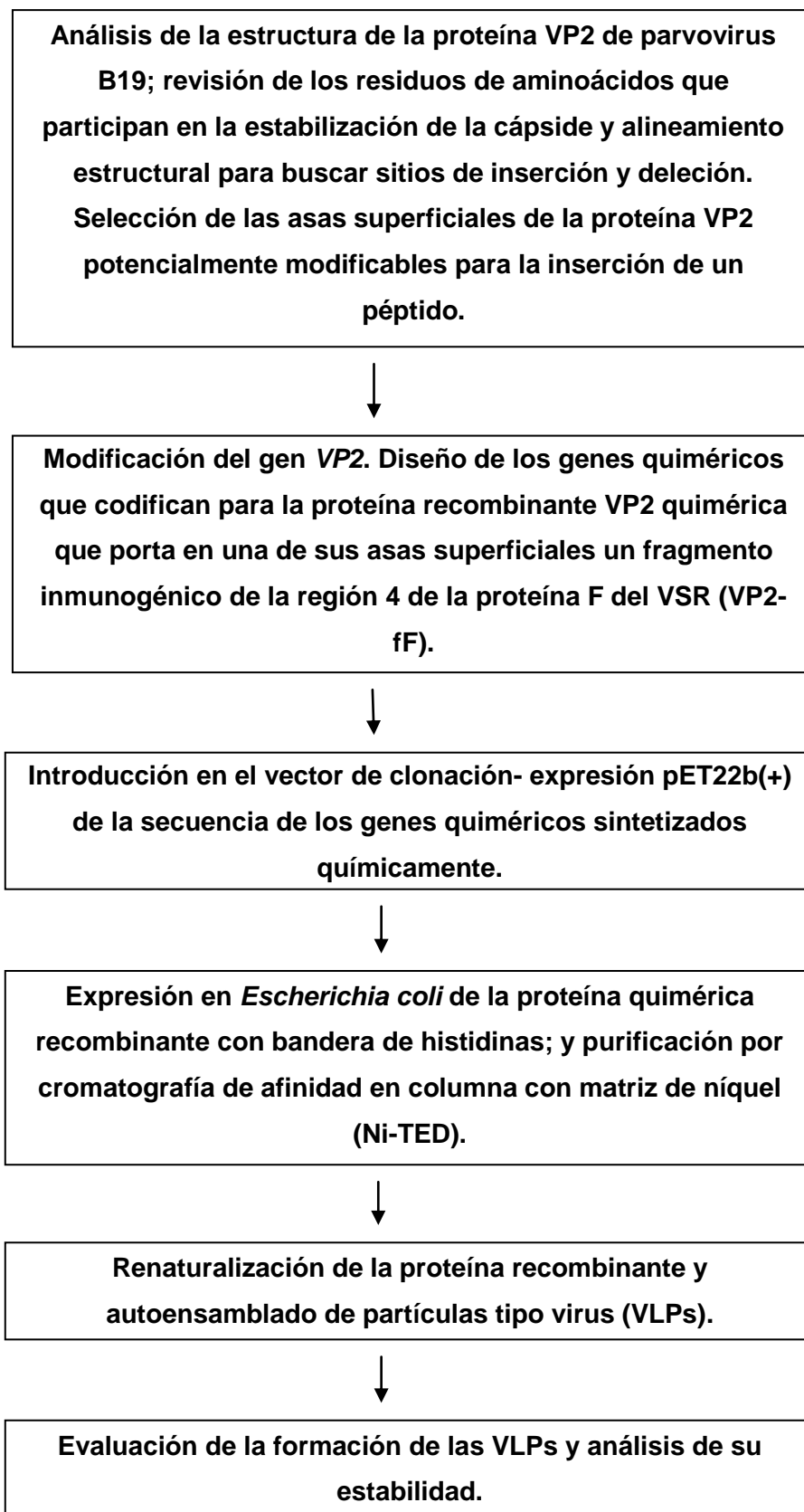
5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL :

Establecer si la extensión de las asas superficiales de la proteína VP2 de parvovirus B19 tiene repercusiones en el ensamble y estabilidad de sus partículas tipo virus (VLPs).

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

- Análisis y selección de asas superficiales susceptibles de modificación en la cápside del parvovirus B19.
- Construcción de los genes quiméricos de las proteínas VP2 y fragmentos inmunogénicos de la proteína F del VSR.
- Clonación en un sistema de expresión procarionte, expresión y purificación de las proteínas quiméricas.
- Análisis de la competencia de las proteínas quiméricas para ensamblar cápsides.
- Análisis de la estabilidad de las VLPs obtenidas.

6 DIAGRAMA GENERAL DEL MÉTODO EXPERIMENTAL

7 MÉTODO EXPERIMENTAL DESARROLLADO

7.1 SELECCIÓN DE ASAS SUPERFICIALES DE LA PROTEÍNA VP2 DE PARVOVIRUS B19 QUE SON FACTIBLES DE MODIFICACIÓN

El análisis de la estructura de los aminoácidos de la proteína VP2, permitió determinar qué residuos de las asas superficiales no participan directamente en la estabilización de la cápside y por tanto son elementos susceptibles de ser modificados. Los datos necesarios para realizar la selección de sitios adecuados para modificar la proteína se obtuvieron considerando criterios estructurales (exposición superficial, movilidad, contactos) y evolutivos (alineamiento de secuencias).

Para visualizar la información resultante del análisis por criterios, se construyó una tabla donde a cada asa superficial (nombrada según los residuos que la conforman), se le asignó un valor en la escala de 1 a 3 signos positivos, según cumpliera satisfactoriamente con la cualidad ó condición planteada en el criterio evaluador. Así que, al asa superficial que presentó más de dos residuos de aminoácidos que no cumplieran con las características buscadas, se le asignó un valor de 1 (+ Problema serio), que implicaba que de cambiarlos posiblemente no se ensamblarían las VLPS; en cambio se asignó un valor de 2 (++ problema tolerable) cuando hasta 2 residuos no cumplieron o parcialmente cumplieron con el criterio; finalmente se asignó el valor máximo de 3 (+++ satisfactorio o sin problema) cuando los residuos en general cumplieran con el criterio y de modificarse estos el ensamblado se mantendría. Y también se asignó un medio punto más (*), cuando se consideró que el ensamblado podría ser posible al poner una baja relación VP2 silvestre y VP2 quimera (1:9 ó 1:1) durante el proceso de repliegamiento/ensamble.

La decisión final para considerar que un asa era susceptible de aceptar en su estructura la inserción de péptidos, se basó en la sumatoria de los valores obtenidos. Las asas con los valores más altos se consideraron positivas; y las asas con los valores más bajos se consideraron negativas y por tanto sus residuos podrían participar directamente en la estabilización de la cápside o de las VLPS (**Tabla 1**).

La información estructural para la identificación y localización de las asas superficiales se obtuvo de los modelos tridimensionales de la subunidad de la

proteína VP2 y de la mitad de una cápside; los cuales se realizaron con el programa PyMol, el cual utilizó las coordenadas atómicas de la estructura cristalográfica del Protein Data Bank (PDB) con número de asignación 1S58 y de la base de datos VIPERdb (VIPERdb.2010b). Las asas que se proyectaron hacia fuera de la cápside se consideraron sin impedimentos estéricos y por tanto se puntuaron con el valor más alto para este criterio.

En el segundo criterio estructural se evaluó la movilidad de las asas con respecto a otros elementos de estructura de la proteína; por lo que se construyó una grafica con los datos de factores B para cada residuo de aminoácido a fin de visualizar como picos los valores más altos (más de 100 \AA^2). Así las asas cuyos residuos en la gráfica se localizaban en los picos más altos, se consideraron muy móviles y se les asignó 3 puntos positivos (+++); en tanto que, a las asas con residuos en picos más bajos se les asignó solo un punto (+).

El criterio estructural de número de contactos, consistió en la búsqueda de aminoácidos de las asas que no forman parte de interacciones con elementos del mismo monómero o con elementos de otros capsómeros. Al consultar en la base de datos VIPERdb se identificaron los residuos que no formaban parte de una interfase ó intercara (área de contacto entre dos subunidades); y los pares de residuos que intervienen en la unión de ensamble entre las subunidades de intercara principales A1-A6, A1-A7 y A1-A2 directamente localizadas en los ejes de simetría de orden 2, 3 y 5 respectivamente (**Anexo 12.1. Fig. A1. Tabla A2.**). Esta revisión de contactos fue fundamental ya que en la parte experimental uno de las restricciones consiste en conservar intactos los residuos que tienen participación energética (contacto) con estas subunidades, para que proceda el ensamblado y se mantenga la estabilidad de la cápside. Por lo tanto las asas cuyos residuos no interaccionan con otros residuos se calificaron con 3 puntos (+++).

El criterio evolutivo supone que los alineamientos de secuencias estructurales proveen información sobre el acortamiento o alargamiento de regiones en una familia de proteínas o en proteínas relacionadas; y por tanto estas modificaciones ocurren porque son tolerables ya que no alteran de forma radical la función de la proteína. En consecuencia, se analizaron los alineamientos estructurales de la proteína VP2 de parvovirus B19 con las secuencias de otras proteínas de cápside de virus relacionados. Partimos del alineamiento realizado por Kaufmann y según la

clasificación realizada por CATH (Kaufmann et al., 2004); también se realizó un análisis de estructuras cercanas por FATCAT (**Anexo 12.1.3. Fig. A3- Fig. A5**). Se consideró que un asa cumplió positivamente con el criterio evolutivo, cuando en las estructuras homólogas alineadas se presentaron inserciones o deleciones en la región correspondiente a un asa de la proteína VP2 de parvovirus.

7.2 MODIFICACIÓN DEL GEN VP2 DEL PARVOVIRUS B19: DISEÑO DE LOS GENES QUIMÉRICOS E INTRODUCCIÓN DE LA SECUENCIA QUIMÉRICA SINTÉTICA EN EL VECTOR pET22b(+)

De las regiones en asas superficiales que en el análisis mostraron poseer la mayoría de las características establecidas en los criterios, se realizó un análisis de las secuencias de aminoácidos para asignar el sitio de modificación exacto.

Como siguiente paso se eligieron las moléculas que habrían de exponerse superficialmente en la proteína quimérica. En este caso se seleccionó la región 4 de la proteína de fusión del VSR (Diseñada y donada por la M en C. Areli Moran, Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas, UNAM) (**Anexo. 12.2**).

Después se revisó la secuencia nucleotídica del gen VP2 contenido en el plásmido pET-VP2-6His (Donado por la Dra. Sánchez-Rodríguez, Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas. UNAM), el cual está formado por el vector comercial pET22b(+) (Novagen) y la secuencia codificante de la proteína VP2 del Parvovirus B19 con una etiqueta de 6 histidinas en el extremo carboxilo terminal (**Anexos 12.2 y 12.3**).

En el gen se establecieron los sitios para la fusión de la secuencia codificante de la región 4 del VSR, considerando que solo se podían realizar inserciones en los nucleótidos correspondientes a los aminoácidos de las asas modificables. Posteriormente se diseñó la secuencia definitiva de los genes quiméricos; *R4A265* (1854 pb) y del *R4A300* (1854 pb), con sitios de restricción enzimática en ambos extremos (**Anexos 12.2 y 12.3**). Cabe destacar que el diseño de los genes quiméricos se envió a un fabricante comercial quien los sintetizó por vía química y los incorporó en un plásmido de clonación (GS51485), del cual se extrajo la secuencia quimérica de VP2 (**Anexo 12.4, Figs. A7 y A8**).

El plásmido pET22b(+) y los plásmidos con genes sintéticos comerciales se sometieron a una digestión simultánea con las enzimas *NdeI* (extremo 5') y *EcoRI* (extremo 3') (New England Biolabs), para obtener los extremos de bases nucleotídicas complementarios requeridos para ligar el producto de PCR del gen quimérico con el vector de expresión pET22b(+). Las secuencias linearizadas con los sitios adhesivos generados por el corte de restricción se purificaron por el método de extracción en gel de agarosa (Quiaex) y se ligaron con DNA ligasa de T4 (New England Biolabs).

El producto de la reacción de ligación se utilizó para transformar células electrocompetentes de *E. coli* cepa *DH5 α* , las cuales se sembraron en medio sólido LB (Luria Bertani) con Ampicilina (Sigma) a una concentración final de 100 $\mu\text{g/mL}$.

De los crecimientos celulares obtenidos se seleccionaron y aislaron 10 colonias, a partir de las cuales se inoculó un tubo con 10 mL de medio líquido LB-ampicilina (100 $\mu\text{g/mL}$). Después de 12 h de incubación (37°C / 250 rpm), los cultivos se cosecharon y por la técnica de lisis alcalina se extrajeron los plásmidos, los cuales fueron solubilizados en H₂O desionizada. De cada plásmido aislado se tomó una muestra que fue digerida con las enzimas *NdeI* y *EcoRI* según el caso, para liberar el gen quimérico como confirmación de su presencia.

Los plásmidos cuya presencia del gen quimérico fue positiva se utilizaron para transformar células electrocompetentes de *E. coli* cepa BL21 (DE3), las cuales se sembraron en medio sólido con ampicilina (100 $\mu\text{g/mL}$).

7.3 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA VP2 SILVESTRE Y DE LAS PROTEÍNAS QUIMERAS

La producción en gran escala y purificación de la proteína VP2 de parvovirus B19, así como de las proteínas quiméricas con fragmentos de la proteína F (VP2-fF), se realizó según el método descrito por Sánchez-Rodríguez et al., 2012, con mínimas modificaciones.

Las colonias obtenidas de la transformación de células de *E. coli* cepa BL21 (DE3) con el plásmido pET en el que sí estaba presente el gen modificado, fueron aisladas.

La eficiencia de expresión de las clonas se probó en un ensayo de inducción a pequeña escala. Se inocularon 10 mL de medio LB-ampicilina con células de una colonia, y se permitió que se dividieran por 12 h, al final de este periodo se tomó 1 mL de cultivo el cual se adicionó a 10 mL de medio con ampicilina.

Se siguió el crecimiento celular por medición de la densidad óptica a 600 nm ($D.O._{600}$), y en el momento en que se alcanzó un valor de absorbencia entre 0.5 y 0.6 se adicionó IPTG (Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido) como inductor, a una concentración final de 0.5 mM. De cada cultivo se tomó una alícuota de 1 mL, antes de la adición del inductor, y posteriormente a las 3 y a las 12 h después de la inducción. Estas muestras se centrifugaron (13,000 rpm, 30 s, 4°C) y cada botón se resuspendió en 100 μ L (microlitros) de agua; 7.5 μ L de este concentrado crudo se mezcló en una proporción 1:5 con amortiguador de carga para proteínas. Para el análisis de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), la mezcla de cada muestra se sometió a ebullición por 12 minutos (min); después se cargó en un gel de acrilamida al 12.5 % y se procedió con la electroforesis en condiciones desnaturizantes, al final de la cual se tiñó el gel con azul de Coomassie.

Para determinar si la proteína recombinante se acumuló en cuerpos de inclusión o permaneció en forma soluble, una muestra extra de 1 mL de los cultivos inducidos por 12 h, se sonicó por 2 min (amplitud 18, 10 s on- 5 off, 4°C. Ultrasonic Processor GEX600) y se centrifugó (13,000 rpm, 1 min, 4°C). Las fracciones soluble e insoluble (precipitado) fueron separadas y se analizaron por SDS-PAGE en condiciones desnaturizantes.

La producción de la proteína recombinante se realizó por escalamiento a 1 litro. Se inocularon 10 mL de medio LB-ampicilina, se dejaron crecer las células toda la noche (37°C a 250 rpm). A partir de este cultivo se obtuvo una muestra de 1 mL que sirvió de inóculo para 100 mL de medio líquido, en las mismas condiciones de incubación por 3 h. Los 100 mL del cultivo se adicionaron a 1 L de medio LB fresco y se continuó la incubación hasta alcanzar una $D.O._{600}$ entre 0.5 y 0.6. Posteriormente se adicionó IPTG al cultivo (0.25 mM final), y se transfirió a un cuarto refrigerado (4°C) por 45 minutos hasta que disminuyó la temperatura a 27°C. En seguida el cultivo se transfirió a un incubador para continuar la inducción a 27°C en agitación constante (150 rpm) por 36 h.

Las células del cultivo inducido se recuperaron por centrifugación (5,000 rpm, 15 min, 4°C), y el botón se resuspendió en **solución A** (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, pH 6.3). Las células se rompieron por ultrasonido (amplitud 28, 10 s (segundos) encendido y 5 s de descanso por 15 min, 4°C). Posteriormente se centrifugó (10,000 rpm, 10 min, 4°C) y se recuperó la fracción insoluble (cuerpos de inclusión).

El botón con los cuerpos de inclusión fue lavado 3 veces con **solución B** (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, Tritón X-100 2%, Urea 3 M, pH 6.3), seguido de 1 lavado con la misma solución más DTT 1 mM, y finalmente con **solución A**. Cada lavado consistió en la resuspensión del botón en 20 mL del amortiguador o solución correspondiente, 1 minuto de sonicación (amplitud 28, 10 s encendido y 5 s de descanso por 15 min, 4°C) y centrifugación (8000 rpm, 10 min, 20°C) para desechar la fracción soluble.

El botón (blanco-amarillento) se disolvió en 50 mL y hasta 150 mL de **solución C** (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, GuHCl 6 M, pH 6.3) con 1 mM de DTT. Para disgregar completamente el botón, se incubó por 24 h a 37°C con agitación constante (180 rpm). Proteínas insolubles y otros sedimentos se eliminaron por centrifugación (13,000 rpm, 30 min, 20°C) y por filtración del sobrenadante obtenido (filtro con poro de 0.45 µm).

A una razón de flujo de 0.5 mL/ min, 25 mL de la fracción con los cuerpos de inclusión solubles se pasó por una columna con 10 mL de resina Protino Ni-TED (Macherey Nagel), previamente equilibrada con 20 mL de **solución C**; donde la proteína recombinante con etiqueta de histidinas fue retenida. Enseguida la columna se lavó con 20 mL de **solución C** y 20 mL de **solución D** (Imidazol 20 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, GuHCl 6 M, pH 6.3). La proteína de interés se eluyó con 10 mL de **solución E** (Imidazol 250mM, NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, GuHCl 6 M, pH 6.3) y luego con 10 mL de **solución F** (Imidazol 500 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, GuHCl 6 M, pH 6.3). La columna se lavó con 2 volúmenes de **solución C** entre el inicio de cada serie o corrida. Para purificar un volumen de 100 mL de cuerpos de inclusión solubles, se requirió realizar 4 corridas; y además para recuperar más proteína recombinante las fracciones que no interaccionaron en un primer momento con la resina, se sometieron a una nueva corrida de purificación.

Para seguir el progreso de purificación de la proteína de interés por SDS-PAGE, se colectaron muestras de 50 μ L de la fracción soluble obtenida en cada etapa de lavado de los cuerpos de inclusión, y de la cromatografía de afinidad. De éstas se eliminó el agente desnaturizante (Urea ó GuHCl) al realizar una diálisis en H₂O durante 12 h a 25 °C en agitación, con recambio de disolvente cada 4 h. Ya que cada muestra individual consistía de pocos microlitros, estos se colocaron en la base de un dispositivo de microdiálisis (tapa de tubo Eppendorf modificado) que se cubrió con una membrana para diálisis poro de exclusión MWCO 12-14000 (Spectra/por), la cual quedó fija cuando se cerró el sistema. Este procedimiento permitió dializar en un volumen de disolvente de 1 L hasta 10 muestras diferentes.

Las fracciones recuperadas de la elución con la **solución D** se reunieron en un solo volumen (40 mL aproximadamente), y la proteína se concentró por centrifugación (4,000 rpm, 12 min, 20°C) usando unidades concentradoras con poro de retención de 50 kDa (Millipore), que se colocaron en un rotor de columpio. En cada centrifugación, por cada 10 mL iniciales, se retuvieron 1.5 mL en el depósito del filtro, este concentrado se centrifugó 2 veces con 10 mL de **solución G** (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, GuHCl 5 M, pH 8.0). La proteína recombinante se recuperó al lavar las membranas internas del filtro con el amortiguador remanente en el depósito (1.5 mL) y con un volumen igual de **solución G**. El volumen final de proteína concentrada que se obtuvo fue de 12 a 15 mL. Cabe destacar que de solución G se preparó un exceso para su posterior uso en la cuantificación de proteína.

Como de la proteína VP2 y de las proteínas quiméricas no se tenía determinado un coeficiente de extinción confiable por la presencia de proteínas contaminantes, la cuantificación de la proteína se realizó, al obtener la absorbencia a 280 nm de la muestra formada por las fracciones eluidas. Para conseguir los valores de referencia requeridos para establecer la relación de absorbencia contra concentración de proteína, se realizó una curva patrón con albúmina (1 mg/mL) en la **solución G** (excedente preparado). Una vez reconstruida la gráfica de absorbencia contra concentración de la proteína de interés, inmediatamente se ajustó la concentración de la muestra hasta 1 mg/mL (solución de trabajo); y a partir de esta dilución se preparó una alícuota de 10 mL a una concentración final de 0.5 mg/mL para realizar los ensayos inmediatos. Destacando que esta es la concentración mínima que se ha reportado como recomendable para iniciar el proceso de diálisis, pues la proteína

soluble recuperada a partir de muestras con concentraciones menores presenta problemas para ser analizada pues no puede ser detectada por los equipos (Sánchez-Rodríguez et al, 2012).

7.3.1 RENATURALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE Y AUTOENSAMBLADO DE PARTÍCULAS TIPO VIRUS (VLPs)

El proceso de replegamiento y de autoensamble de las VLPs de la proteína recombinante VP2 y las proteínas quiméricas VP2-fF, se realizó al eliminar el agente desnaturizante, cloruro de guanidinio (GuHCl), mediante una diálisis al equilibrio (Sánchez-Rodríguez et al., 2012).

En el ensayo de replegamiento se colocó 1.5 mL de muestra con proteína a una concentración de 0.5 mg/mL en una membrana de diálisis con poro de exclusión MWCO 12,000 -14,000 (Spectra/por), y se dializó contra 50 mL de amortiguador de PBS (Na_2HPO_4 10.5 mM, KH_2PO_4 1.76 mM, NaCl 250 mM, KCl 2.7 mM, pH 7.4) o amortiguador de acetatos (CH_3COOH 20 mM, pH 4.0.0), por un tiempo mínimo de 36 h a 4°C con agitación constante y cambio de amortiguador cada 12 h.

7.4 EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE LAS VLPs

7.4.1 DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DDL)

Como parte de la caracterización de las cápsides formadas con proteína VP2 o VP2 quiméricas, de las muestras obtenidas por diálisis al equilibrio se realizó el análisis de tamaño de partícula por Dispersión Dinámica de Luz (DDL) (Dynamic light scattering, DLS) en un equipo Zetasizer μV (Malvern).

Las muestras de proteínas recién replegadas por diálisis, se recuperaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL. En las muestras dializadas a pH 7.4 se observó la formación de un precipitado, por tal motivo, dentro del mismo tubo, un volumen de 900 μL se resuspendió de 5 a 10 veces a través de un sistema de jeringa con aguja (32 mm x 0.80 mm) (BD Plastipack). En seguida cada muestra se centrifugó (10,000 rpm, 5 min, 4°C), y 500 μL del sobrenadante se pasaron por un microfiltro con poro de 2 μm .

De este filtrado se depositaron 200 μL en una celda de cuarzo del dispersor de luz e inmediatamente se inició el análisis. La exploración consistió en 10 lecturas con 10 medidas de 10 segundos cada una. Los restantes 300 μL filtrados se pasaron por un poro de 0.22 μm , y se analizaron también por DDL. En el caso de las proteínas dializadas en solución de acetatos a pH 4.0, las muestras son solubles y no requieren ser resuspendidas. En este caso se analizó un volumen de 200 μL del sobrenadante obtenido por centrifugación y una alícuota microfiltrada por un poro de 0.22 μm .

Para la determinación del tamaño de las partículas presentes se consideraron los valores promedio de las lecturas para cada muestra. Los parámetros programados para la dispersión fueron: análisis-APS ó tamaño, material-proteína, disolvente-agua; índice de refracción 1.33, viscosidad 1.003 cP y temperatura 20°C.

La concentración de proteína de muestras recuperadas después de la diálisis al equilibrio en solución amortiguadora de PBS o solución amortiguadora de acetatos, y de muestras obtenidas después de cada etapa de microfiltrado, se cuantificó por el microensayo de BCA-Cu⁺⁺ (volumen de muestra 100 μL con 5 μL de SDS al 10%).

7.4.2 GRADIENTE DE CLORURO DE CESIO (CsCl)

Muestras de proteína recién dializadas al equilibrio fueron utilizadas para determinar la densidad de las partículas ensambladas en cápsides completas y, de las partículas de los intermediarios de ensamble. La solución de gradiente formada por CsCl-PBS (1.33 g/mL de CsCl) se preparó al mezclar 40.8 g de CsCl más 79.2 mL de solución amortiguadora PBS con 10 mM de EDTA, tritón X-100 0.5% ajustando al final a pH 7.4; y para la preparación de la solución para gradiente de CsCl-acetatos (1.33 g/mL de CsCl) se siguió el mismo procedimiento pero usando solución amortiguadora de acetatos y se ajustó al final a pH 4.0 (Sánchez-Rodríguez et al., 2012). Antes de cada uso se filtró cada una de estas soluciones y se verificó el pH.

En un tubo de 5 mL para ultracentrífuga (Ultra clear, 11 X 60 mm, Beckman) se colocaron 3.5 mL de solución para gradiente de CsCl-PBS (pH 7.4) o de solución para gradiente de CsCl-acetatos (pH 4.0) según el pH de la muestra, y se depositó (sin mezclar) sobre la superficie del líquido una cantidad de 500 μL a 600 μL de

proteína dializada al equilibrio. Las muestra se centrifugaron a 60 000 rpm, 9 h a 20°C, en un rotor SW 60 Ti, en una ultracentrífuga Beckman Optima XL 100K.

Antes de iniciar la ultracentrifugación se marcó en el tubo la altura del volumen de la solución de gradiente y una vez formados los gradientes de densidad también se marcó el sitio donde se estacionaron las bandas de proteína. Para determinar la densidad de las VLPs de las bandas de cada muestra de proteína se tomaron 100 µL de muestra que se depositaron en un tubo Eppendorf previamente pesado.

7.4.3 EFECTO DEL GuHCl EN EL DESENSAMBLE DE LAS VLPs

Para determinar el efecto del GuHCl en el desensamble de cápsides de proteína VP2 y VP2 quiméricas modificada en asas, se realizó un ensayo en el que se adicionó el agente caotrópico en 3 diferentes concentraciones finales.

De una muestra de 1.5 mL de proteína recién dializada (36 h, 4°C) en PBS (pH 7.4) ó en acetatos (pH 4.0), se separó una alícuota de 100 µL (muestra total). El volumen restante se centrifugó y mantuvo a 4°C hasta su uso. Para cada condición a probar se tomaron 100 µL del sobrenadante y se microfiltraron en poro de 0.22 µm. Estas muestras se depositaron en la celda del dispersor de luz, y se les adicionó solución de desensamble (Na₂HPO₄ 10.5 mM, KH₂PO₄ 1.76 mM, NaCl 250 mM, KCl 2.7 mM, GuHCl 8 M, pH 7.4), hasta alcanzar una concentración total de 0.5 M ó, 1.0 M ó, 5.0 M de GuHCl, según el caso. Para cada muestra se determinó el tamaño de partícula por DDL antes y después de adicionar el GuHCl.

8 RESULTADOS Y ANÁLISIS

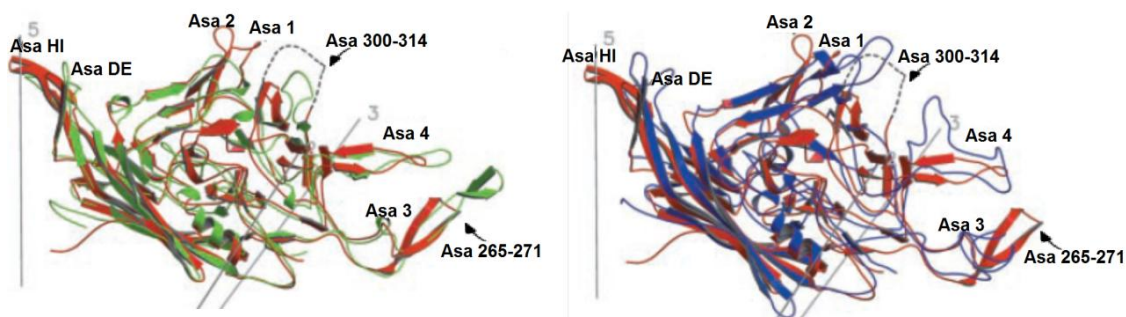
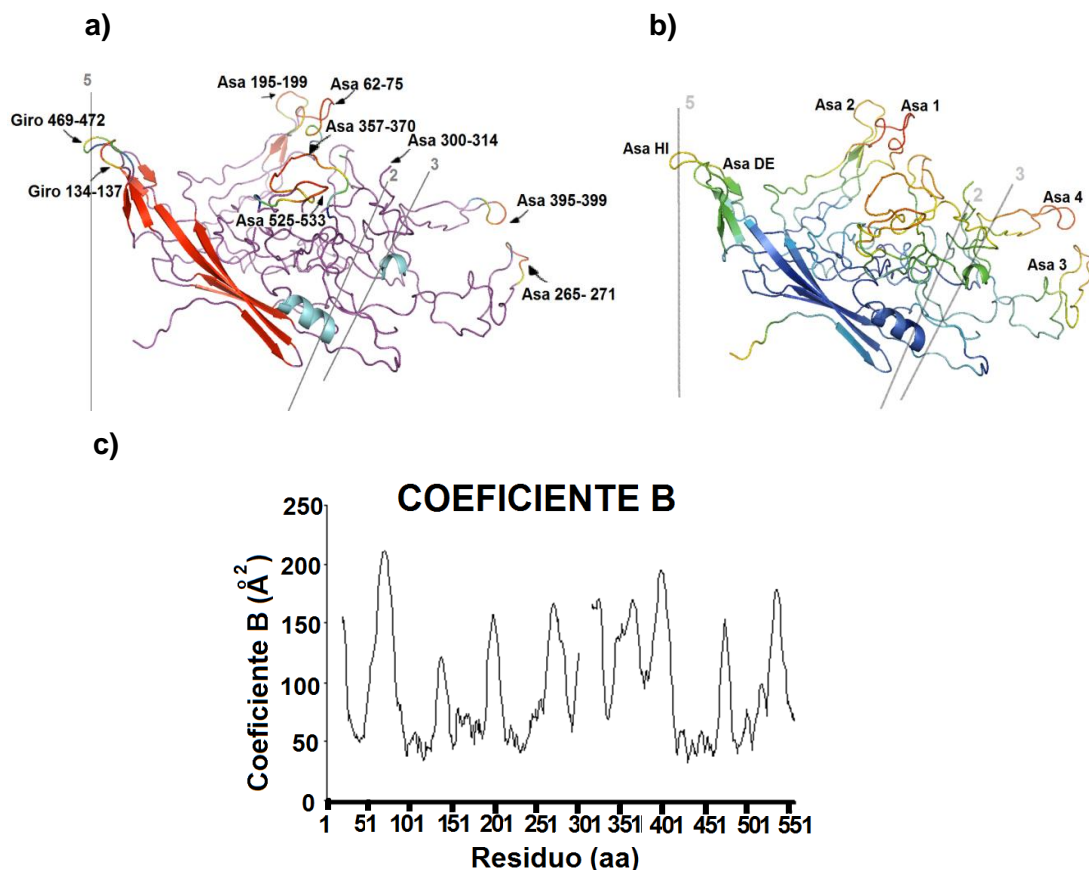
8.1 SELECCIÓN DE ASAS SUPERFICIALES DE LA PROTEÍNA VP2 DE PARVOVIRUS B19 QUE PERMITEN MODIFICACIONES

Las proteínas que forman las cápsides de virus icosaédricos, entre ellos los integrantes de la familia *Parvoviridae* y géneros relacionados, presentan similitudes en las secuencias que codifican para una estructura base de ocho hebras (Rossmann & Johnson, 1989; Kerr et al., 2006). Estas zonas con pocas variaciones reflejan regiones conservadas, que muy posiblemente cumplen una función de reconocimiento o en estabilidad, por lo que se consideró que no serían adecuadas para su modificación. Más, la diferencia entre estos virus radica en la extensión o deleción de secuencias correspondientes a sus asas, indicando que específicamente las estructuras en la superficie de la cápside, permiten modificaciones sin comprometer la interacción entre subunidades (Johnson, 1996; Kerr et al., 2006; Kaufmann et al., 2004).

Se analizaron las siguientes asas superficiales y giros en la estructura de las VLPs de parvovirus B19: 62-75 aa (**sschnasgkeakvc**), giro 134-137 aa (**ktgg**), 195-199 aa (**qgisg**), 265- 271 aa (**dtlggdp**), 300-314 aa (**kegdsstgagkalt**), 357-370 aa (**ttygnaedkeyqqg**), 395-399 aa (**nkgqtq**), giro 469-472 aa (**giks**) y 525-533 aa (**ptatdakqh**) (**Fig. 10a**).

Como criterios de selección de las asas a modificar se consideraron las siguientes características: exposición superficial (**Fig. 10a**), movilidad térmica (factores B altos) (**Fig. 10b y c**), participación en contactos en las intercaras (**Anexo 12.1.2. Tabla A2**), y la existencia de evidencia evolutiva de modificaciones en las secuencias de esas asas (alineamiento con secuencias de virus relacionados).

Analizando el alineamiento estructural entre las secuencias de las proteínas de la cápside de virus de la familia *Parvoviridae* y de virus no relacionados, realizado por Kaufmann (Kaufmann et al., 2004) (**Fig. 11; Anexo 12.1.3.3, Fig. A3-A5**), y de un alineamiento con FATCAT con las estructuras 2G8G, 2QA0 y 1LP3 (**Anexo. 12.1.3.2**) se detectó qué zonas presentan insertos y supresiones en las regiones correspondientes a asas superficiales.



Las asas del parvovirus B19 seleccionadas para modificación presentan como características destacables valores de coeficientes B altos, los residuos de aminoácidos que las conforman no están involucrados en la unión entre capsómeros y evolutivamente para el asa 265-271 y el asa 300-314, existen elementos que sugieren la existencia de modificaciones naturales en virus relacionados (Hueffer & Parrish, 2003; Kaufmann et al., 2004; DiPrimio et al., 2008).

De acuerdo con la evaluación se consideró que la modificación de las asas **62-75**, **265-271** y **300-314** podría desestabilizar poco la estructura de la VLP (**Tabla 1**; **Anexo 12.1**; **Tablas A1, A3 y A4**).

Criterio Asa o giro	Estructura					Evolutivo		Decisión Final
	Exposición superficial	Coeficiente B	Contactos		Energía intercara	Disimilitud Alineamiento		
			En asa	En intercara				
62-75	+++	+ Alto	++	A7-A1	+++	++	Mayor en B19	Positiva 2
134-137 giro	++*	Mediano	+	A1-A2, A2-A1	+	+++	+3 aa	Negativa *
195-199	++	Alto	++	A1-A2	++	+++	+9 aa	Positiva 3
265-271	++	Alto	++	A7-A1	+++	+++	Inserto	Positiva 2
300-314	+++	Indeter.	+++	No se observa	+++	+++	Inserto (Adenovirus)	Positiva 1
357-370	++*	Alto	++	A1-A7	+++	++	Mal alin.	Positiva 3 *
395-399	++	Indeter.	+++	A1-A7	+++	++	Reg. alin.	Positiva 2
469-472 giro	+++	Indeter.	++	A1-A2	++	++	Reg. alin.	Positiva 3
525-533	+++	Altos	++	A2-A1	+	++	Inserto	Negativa

Tabla. 1. Resumen de la evaluación de asas y giros de la proteína VP2 de parvovirus B19, examinadas para la modificación de residuos considerando criterios cualitativos de estructura y evolutivo (alineamiento). Las estructuras en asas analizadas se nombraron según los residuos que las conforman. Simbología según el grado de permisividad para modificación: +++, Sin problema; ++, problema tolerable; +, problema serio. La decisión positiva se asigna a las estructuras cuyos residuos tienen posiciones que no interaccionan directamente o influyen estructuras cercanas que están involucradas en la estabilidad de la estructura de cápside (* Se puede permitir el ensamblado poniendo una baja relación VP2 silvestre: VP2 quimera (1:9 ó 1:1) durante el replegamiento/ ensamble). Abreviaturas: Indeterminado, Indeter; Mal alineamiento, Mal alin; Regular alineamiento, Reg. Alin.; aminoácidos, aa; intercara del icosaedro A1, A1; intercara del icosaedro A2, A2; intercara del icosaedro A7, A7.

Por cuestiones de límite de tiempo, de las 3 posibles asas consideradas como más permisibles para modificar, solo se utilizaron los genes quiméricos codificantes del

asa 265-271 y 300-314 (**Anexo 12.2 y 12.3**), y con ellos posteriormente se expresaron las proteínas correspondientes. En la **tabla 2** se muestra el sitio exacto en donde se incorporó la secuencia del gen *F* del VSR.

Asa	Residuos de aminoácido	Secuencia nucleotídica original de las asas de la proteína VP2 de parvovirus B19	Sitio de modificación
Asa 265 a 271	DTLGGDP	GATACGCTG / GCGGTGATCCT Secuencia ác. nucleico 793 a 814 Longitud de la secuencia 21 pb Obtención del extremo 5' de la base 793 a 801 y del extremo 3' de la base 802 a la 813	L/ GG Residuo 267 y 268
Asa 300 a 314	KEGDSSTGAGKALT	AAAGAGGGCGACTCTTCC / AGTACGGGCGCCGGCAAGGCGCTGACG Secuencia ác. nucleico 898 a 942 Longitud de la secuencia 45 pb Obtención del extremo 5' de la base 915 a la 932 y del extremo 3' de la base 933 a 959	S/ ST Residuo 305 y 306

Tabla. 2. Sitio en la asa 265-271 y 300-14 donde se realizó la modificación de la secuencia de la proteína VP2 de parvovirus B19. Residuos de aminoácidos de las asas seleccionadas. Secuencias nucleotídicas que se modificaron para dividir cada asa en dos mitades; un extremo izquierdo (5') y un extremo derecho (3'); y fusionar dentro parte del gen de la proteína F del VSR. En el asa 300-314 se cambió el residuo 306 (N) por un residuo (S), secuencia encontrada naturalmente en el asa del virus SPV (Acceso: AAA74975.1). En la estructura cristalográfica 1S58 del PDB el extremo final del asa 67 presenta un cambio del residuo 77 (T) por un residuo (S), aunque naturalmente varios parvovirus presentan el residuo serina.

8.1.1 SECUENCIAS FORÁNEAS Y SITIOS DE INSERCIÓN DENTRO DE LAS ASAS 62-75, 265-271, Y 300-314

Como antecedentes de la modificación de la proteína VP2 con fragmentos heterólogos, se han realizado trabajos en donde se demostró que la proteína VP2 es capaz de ensamblarse en VLPs cuando transporta pequeños epítomos de otros virus en una región cercana a un asa superficial y en el extremo amino terminal (Brown et al., 1994; Amexis & Young, 2006). Sin embargo, no se ha dilucidado si las proteínas quiméricas cuyas asas presenten epítomos heterólogos de más de 20 residuos o con plegamiento definidos, son capaces de permitir el establecimiento de interacciones supramoleculares para formar ensamblados estables.

De entre las múltiples estructuras tridimensionales para ser transportadas en la cápside del parvovirus se insertó en el gen de la proteína VP2 la secuencia nucleotídica codificante de la región antigénica 4 de la proteína F del VSR. Esta estructura es un epítomo de tipo lineal de 57 aminoácidos (McLellan et al., 2010; McLellan et al., 2011; McLellan et al., 2013) (**Figs.12a y 12b**).

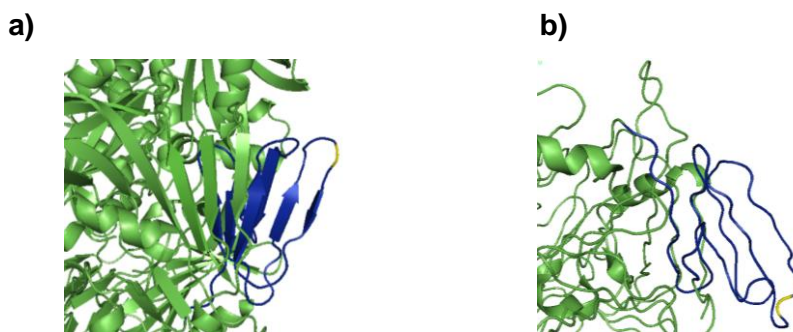


Fig.12. Estructura cristalográfica de la proteína F del VSR y localización del sitio antigénico IV. a) Estado de prefusión. Acercamiento de la región 4 de la proteína F (PDB 4MMV). **b)** Estado de postfusión. Acercamiento de la región 4 de la proteína F (PDB 3RKI). Protómero de la proteína F en verde, sitio antigénico IV en azul y, en amarillo el residuo 429 que es reconocido por anticuerpos (Modificado de McLellan et al, 2011 y McLellan et al., 2013).

La información previamente expuesta es importante, ya que en la producción *in vitro* de VLPs el proceso de ensamblado depende en gran medida del establecimiento y mantenimiento de interacciones dentro de la estructura de la proteína y entre subunidades contiguas, así como del ambiente fisicoquímico en donde es posible la generación de las fuerzas de ensamble.

8.2 MODIFICACIÓN DEL GEN VP2 DE PARVOVIRUS B19

8.2.1 INTRODUCCIÓN DE LA SECUENCIA QUIMÉRICA EN EL VECTOR pET-22b (+)

Se diseñaron dos genes quiméricos: *R4A265* el cual se caracteriza por presentar la secuencia del gen *F* del VSR que se traduce en la región 4 de la misma proteína, dentro de la secuencia nucleotídica correspondiente al asa 265 del gen *VP2*; y *R4A300* que también presenta ese mismo fragmento del gen *F* pero en los nucleótidos correspondientes al asa 300 del gen *VP2*. Ambos genes se obtuvieron de un proveedor comercial (Epoch Life Sciences) y con ellos se realizaron los posteriores ensayos (**Anexo 12.4, Fig. A7 y A6**).

El plásmido pET22b(+) y los plásmidos con los genes quiméricos clonados *GS51485-4 pBSK-R4A265* (*Gen R4A265*) y *GS51485-6 pBSK-R4A300* (*Gen R4A300*) fueron digeridos en una restricción enzimática que reconoce los sitios *NdeI* y *EcoRI*.

Enseguida el vector pET-22b(+) linearizado y las secuencias quiméricas con extremos adhesivos fueron ligados.

Los productos resultantes de la ligación se nombraron pET-R4A265 y pET-R4A300, según el gen quimérico que portaban, y con ellos se electroporaron células electrocompetentes de *E. coli DH5α* para posteriormente aislar gran cantidad de plásmidos. Con los plásmidos quiméricos recuperados se transformaron células competentes de *E. coli* BL21(DE3) y de las clonas obtenidas se realizaron ensayos de eficiencia de expresión de las proteínas de interés.

8.3 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA RECOMBINANTE EN *E. coli* Y PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

En el ensayo de expresión de las proteínas quiméricas en pequeña escala, se observó que varias clonas transformadas con el mismo plásmido mostraron una eficiencia homogénea en la producción de la proteína quimérica recombinante R4A265 (modificada en el asa 265 con región 4 del VSR) y R4A300 (modificada en el asa 300 con región 4 del VSR). Así también a la par se realizó la expresión de la proteína VP2 silvestre, y se comparó con los resultados generados para las proteínas quiméricas.

En 100 mL de cultivo de células transformadas con los plásmidos quiméricos se probó otro ensayo de expresión de las proteínas, este consistió de una inducción (D.O. de 0.7) con 0.5 mM de IPTG e incubación hasta por 12 h a 37°C.

El análisis por SDS-PAGE de los extractos celulares reveló que en el patrón de proteínas totales de la colonia 2 con plásmido pET-R4A300 (R4A300-2) y de la colonia 2 con el plásmido pET-R4A265 (R4A265-2), se expresó una proteína de aproximadamente 59 kDa (**Anexo 12.5. Fig. A9**), que no se observa en cultivos de células *BL21(DE3)* no transformadas o en células transformadas con el plásmido pET22b(+) no modificado. Además, entre mayor es el tiempo de inducción, se recupera más proteína, por tal causa para la producción a gran escala se siguió una inducción por 36 h, se disminuyó la temperatura a 27°C y se usaron cultivos celulares recién transformados con este plásmido (**Fig. 13**).

La eficiencia de expresión en *E coli*, de las proteínas quiméricas fue similar a la de la proteína VP2 silvestre, en las condiciones de expresión probadas. La expresión para las 3 proteínas solo se ve afectada cuando las clonas se originaron de células electrocompetentes que tardan en crecer después del proceso de electroformación.

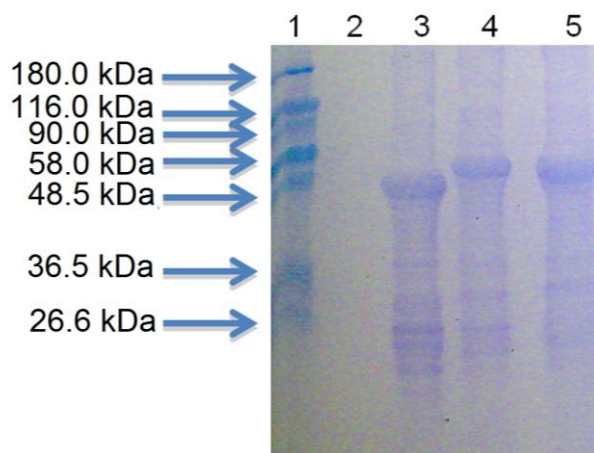


Fig. 13. Expresión de la proteína VP2 silvestre y proteínas quiméricas R4A265 y R4A300. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12.5%, teñido con azul de Coomassie, de las proteínas contenidas en los extractos celulares de cultivos de bacterias transformadas, que expresan la proteína VP2 silvestre ó las proteínas quiméricas modificadas. En los cultivos celulares la expresión de las proteínas recombinantes fue inducida por adición de IPTG (0.5 mM) seguido de incubación a 27°C por 36 h. Carril 1. Marcador de peso molecular (Prestained molecular Weight Marker- M.W.26 kDa-180 kDa, Sigma); Carril 3. Extracto total de una colonia transformada con el plásmido pET-VP2-6His, que expresa la proteína VP2 silvestre de 561 aa (52 kDa); Carril 4. Extracto total de una colonia transformada con el plásmido pET-R4A265 que expresa la proteína quimérica R4A265 de 618 aa (59 kDa); Carril 5. Extracto total de una colonia transformada con el plásmido R4A300 que expresa la proteína quimérica R4A300 de 618 aa (59 kDa). Estas proteínas recombinantes fueron nombradas para su posterior identificación con la misma clave del gen quimérico del cual se originaron.

8.3.1 PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

El rendimiento en la purificación por afinidad para la proteína de VP2 silvestre y de las proteínas recombinantes se vio influida por las pérdidas en los lavados del proceso de recuperación de los cuerpos de inclusión a partir del cultivo crudo (datos no mostrados), y por la presencia de proteínas contaminantes que no se pudieron eliminar con la **solución B**. Lo que invita a mejorar el método de recuperación inicial.

Después de realizar varias purificaciones a partir de cultivos celulares, se estableció que era conveniente disolver los cuerpos de inclusión en 50 mL de solución C con DTT seguido de una incubación por 48 h (37°C), y después adicionar más solución hasta un volumen de 100 mL. Al respecto se observó que se requirió más solución C cuando había más proteínas contaminantes que coloreaban de amarillo la muestra trabajada.

En la purificación por cromatografía de afinidad de la proteína VP2 (**Anexo 12.5. Fig. A10**) y proteínas quiméricas R4A265 y R4A300, las mejores condiciones de recuperación consistieron en lavar los cuerpos de inclusión con 2 volúmenes de **solución C**, seguido de 2 volúmenes de **solución D**, 1 volumen de **solución E** y elución con 1 volumen de **solución F**. Del volumen de 25 mL de cuerpos de inclusión solubilizados, aproximadamente más de la mitad del contenido en proteína pasó a través de la columna, es decir no alcanzó a unirse a la matriz de afinidad. El sobrenadante que no interaccionó en la primera corrida con la resina de afinidad se volvió a pasar por la columna y de él se recuperó fracciones menos contaminadas donde predominó la proteína de interés (Datos no mostrados).

De una serie de 4 corridas (100 ml de cuerpos de inclusión en total), después de realizar todos los pasos de purificación, se logró un rendimiento final de 17-19 mg de proteína por litro de cultivo inicial (cuantificación por absorbencia a 280 nm). Para obtener una mayor cantidad de proteína se realizó una segunda serie de 4 corridas de purificación con las fracciones de los cuerpos de inclusión que no interaccionaron con la matriz de níquel durante la primera serie de corridas de purificación, De esta manera después de realizar las 8 corridas de purificación se logra alcanzar como mínimo un rendimiento de 40 mg/mL de proteína recombinante por litro de cultivo celular inicial. (**Tabla. 3**). La cantidad de proteína recuperada puede ser mayor si se realizan mas series de corridas usando las fracciones de los lavados con **solución C** (Datos no mostrados).

PROTEÍNA	VP2	R4A265	R4A300
Peso botón celular Proteína recuperada	4.8564 g 0.0191 g	4.4941 g 0.0194 g	4.5318 g 0.0173 g
Cuerpos de inclusión (proteína total) Antes de purificar (100 mL)	5.20 mg/mL 100%	3.62 mg/mL 100%	4.18 mg/mL 100%
Fraciones eluidas (40 mL) (proteína recombinante)	2.84 mg/mL 21.84 %	2.27 mg/mL 25.15%	2.54 mg/mL 24.35%
Fraciones eluidas concentradas (15 mL)	1.27 mg/mL 3.68%	1.30 mg/mL 5.37%	1.15 mg/mL 4.14 %
Proteína purificada recuperada (mg)	19 mg	19 mg	17 mg

Tabla 3. Rendimiento de proteína obtenida en el proceso de purificación de VP2, R4A265 y R4A300

Las unidades concentradoras en condiciones desnaturalizantes solo funcionaron para concentrar la muestra, eliminar el imidazol y cambiar a la **solución G**, pues la retención y exclusión en estos filtros depende también de la forma de la partícula, por lo que los pasos importantes de purificación se centraron en las condiciones de la cromatografía de afinidad. En este proceso se pierde parte de la muestra (tanto proteínas contaminantes y proteína de interés), hecho que se corroboró al correr un gel de acrilamida al 12.5% en condiciones desnaturalizantes (Datos no mostrados).

La pureza de la proteína recuperada VP2, y proteínas quiméricas no fue del 100%, pues se corrió una muestra obtenida de las eluciones, donde se observó por debajo de la proteína de interés un leve patrón de bandas que parece corresponder con las proteínas *rpmB* (50S ribosomal subunit L28) y *crp* (catabolite gene activator protein), que se producen durante la sobreexpresión de proteínas recombinantes, y además se ha reportado compiten contra las proteínas con etiqueta de histidinas durante la cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC) (Bartlow et al., 2011) (**Fig. 14**). Por lo que es conveniente, desde el paso de recuperación de cuerpos de inclusión, eliminar estas proteínas contaminantes, que parecen tener una fuerte afinidad por la matriz de níquel.

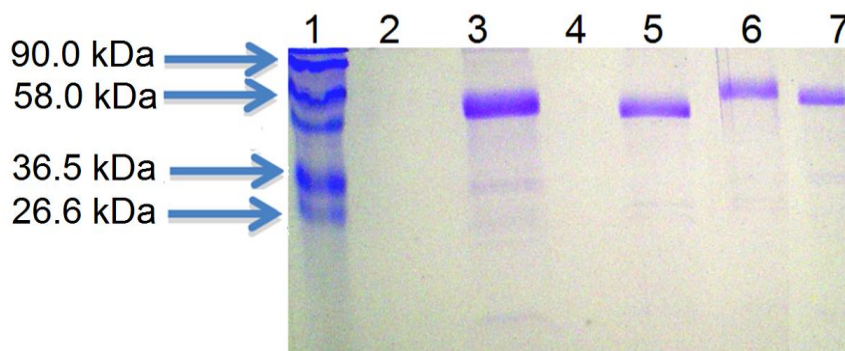


Fig. 14. Proteína VP2, R4A265 y R4A300; obtenidas de la purificación por cromatografía de afinidad. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12.5%, teñido con azul de Coomassie, de las proteínas contenidas en una muestra donde se concentraron las fracciones eluidas con 250 mM de Imidazol. Carril 1, marcador de peso molecular (Prestained molecular Weight Marker- M.W.26 kDa-180, Sigma); carril 3, concentrado de la proteína R4A300 (59 kDa), muestra de un primer intento de purificación; carril 5, concentrado de la proteína VP2 silvestre (52 kDa); carril 6, concentrado de la proteína R4A265 (59 kDa); carril 7, concentrado de la proteína R4A300 (59 kDa) de un segundo lote de purificación.

8.4 EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE LAS VLPS

8.4.1 TAMAÑO DE PARTICULA: DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DDL)

En varios estudios de caracterización de tamaño de las VLPs, obtenidas, *in vitro*, se ha recurrido a la técnica de dispersión dinámica de luz para determinar el diámetro hidrodinámico y el tamaño de partícula, así como la homogeneidad de las poblaciones de partículas presentes (polidispersión de la muestra). Los reportes indican que dependiendo de condiciones como fuerza iónica, pH y temperatura es posible obtener una variedad de especies de ensamblado que solo es limitada por las características estructurales intrínsecas de las proteínas (Nilsson et al., 2005; Ausar et al., 2006; Hu et al., 2011).

El ensamblado de poblaciones de VLPs después de la diálisis al equilibrio de las muestras con proteína VP2 silvestre, R4A265 y R4A300, se evaluó al analizar por DDL el tamaño de las partículas presentes en las muestras a pH 7.4 y pH 4.0. Por esta técnica se midió y determinó el diámetro de las partículas solubles.

La media del tamaño de partícula de las VLPs de proteína VP2 silvestre en las muestras dializadas a pH 7.4 fue de 22.76 nm (SD \pm 1.786) a 27.13 (SD \pm 5.29) nm, diámetro que coincide con datos previamente reportados para esta proteína (Viveros-Belmonte, 2012; Sánchez-Rodríguez, 2012); en las mismas condiciones para la proteína R4A265 el tamaño osciló entre 22.49 nm (SD \pm 5.84) a 23.51 nm (SD \pm 8.13), mientras que para la proteína R4A300 fue de 16.85 nm (SD \pm 2.43) a 29.45 nm (SD \pm 6.03) (**Figs. 15 y 16**).

Debido a que las proteínas VP2, R4A265 y R4A300 se agregan rápidamente, por DDL se detectaron partículas con mayor tamaño de partícula cuya presencia representa un bajo porcentaje de la muestra, Sin embargo en algunos ensayos la proporción de microagregados representó aproximadamente el 20% de la masa de la muestra, esto ocurría cuando transcurrían más de 3 minutos entre el final de la diálisis y la lectura de la muestra en el DDL.

En las muestras con proteína R4A300 para promover la formación de VLPs de mayor tamaño y menos variables, se probó el ensamblado por diálisis al equilibrio con muestras de la proteína VP2 en una proporción 1:1 y 10:1. Para las muestras cuya

proporción de proteína VP2 y R4A300 fue de 1:1, las partículas ensambladas presentaron un tamaño de 17.1 nm (SD \pm 3.23) a 21 nm (SD \pm 5.43) de diámetro, en tanto que las partículas ensambladas con mayor proporción de proteína silvestre mostraron un tamaño de partícula entre 22.24 nm (SD \pm 3.94) y hasta 34.38 nm (SD \pm 7.61) (Fig. 17).

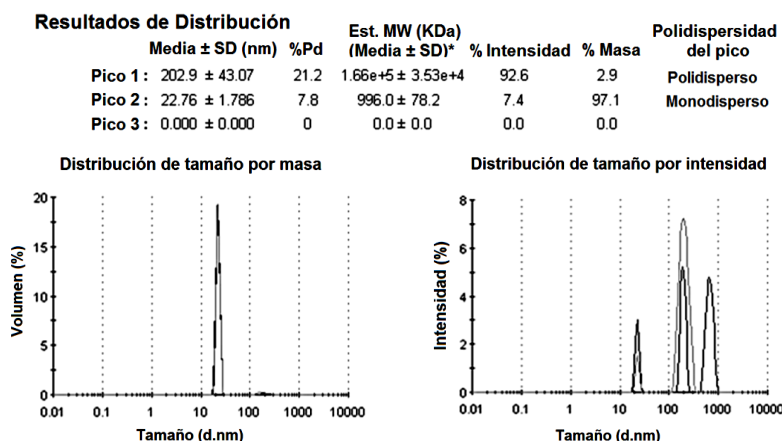


Fig. 15. Distribución de tamaño de partícula en la muestra de VP2 silvestre dializada durante 36 h en PBS, pH 7.4. Gráfica de distribución de tamaño por masa (Izquierda). En la muestra analizada el 97.1 % de la masa corresponde a las VLPs que presentan un diámetro de partícula (d.nm) de 22.76 nm (SD \pm 1.786 nm) mientras que 2.9% de la masa corresponde a microagregados con un tamaño de 202.9 nm (SD \pm 43.07 nm). **Gráfica de distribución de tamaño por intensidad (Derecha).** En la curva de distribución de intensidad (%) vs tamaño, el 92% del área corresponde a la señal emitida por microagregados con un diámetro de 202.9 nm, en tanto que 7.4% de la señal la emiten las VLPs de 22.76 nm. Los microagregados son de varios tamaños representados por un pico de distribución polidisperso (polidispersión (Pd), 21.2 %), en tanto que las VLPs presentan una distribución de tamaño uniforme representado por un solo pico monodisperso (Polidispersión, 7.8%). Cabe destacar que el reporte por intensidad (%) vs tamaño nos indica que hay una gran diversidad de partículas de macroagregados de VLPs o intermediarios de diferentes tamaños. En cambio en el reporte de volumen (%) vs tamaño, se destaca que las partículas de 22.76 nm conforman el mayor porcentaje de la masa en la muestra; lo que indica que existe un mayor número de VLPs de 22.76 nm y muy pocas partículas de 202.9 nm.

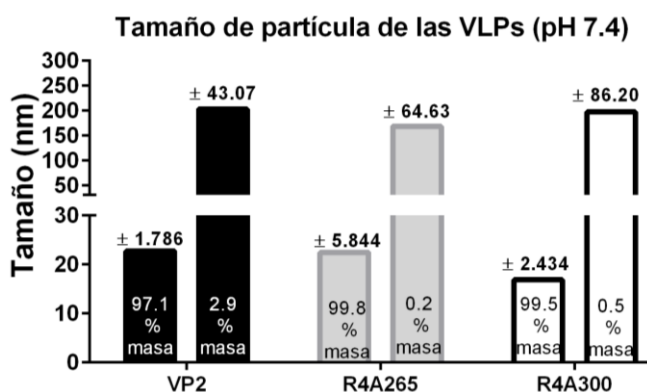


Fig. 16. Distribución de tamaño de partícula en muestras de VP2 silvestre y proteínas químéricas; dializadas durante 36 h en PBS a pH 7.4, y microfiltradas con poro de 0.22 μ m. Tamaño de especies en la muestra de la proteína VP2 silvestre (Barras negras), de la proteína R4A265 (Barras grises) y de la proteína R4A300 (Barras blancas) Los números arriba de las barras corresponden a las desviaciones estándar (SD \pm) para cada distribución de tamaño de partícula, y los números dentro destacan el porcentaje en masa de cada especie presente en la muestra. Datos obtenidos del análisis por DDL de tamaño por volumen.

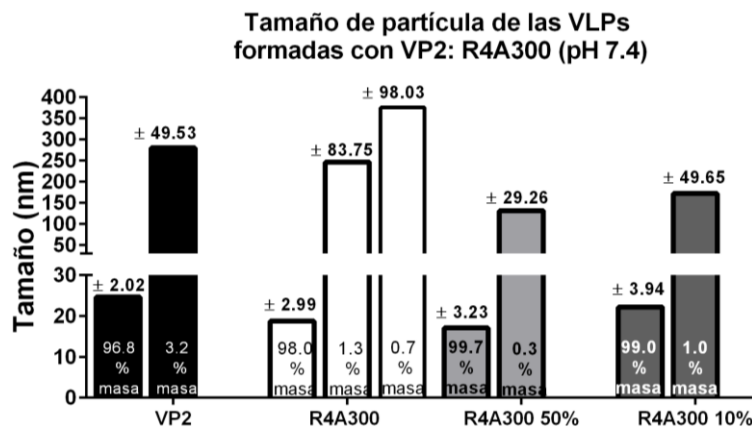


Fig. 17. Distribución de tamaño de partícula en muestras de VP2 con R4A300 dializadas durante 36 h en PBS a pH 7.4, y microfiltradas con poro de 0.22 μm . Tamaño de especies obtenidas de la proteína VP2 silvestre (Barras negras), de la proteína R4A300 (Barras blancas), y de la combinación de VP2 y R4A300 en una proporción 1:1 (barras gris claro) y en una proporción 1:10 (Barras gris oscuro). Los números arriba de las barras corresponden a las desviaciones estándar (SD) para cada distribución de tamaño de partícula, y los números dentro destacan el porcentaje en masa de cada especie presente en la muestra. Datos obtenidos del análisis por DDL de tamaño por volumen.

A pH 7.4, las muestras tanto de la proteína silvestre como de las quimeras presentan un porcentaje alto de polidispersión (55%), que indica la existencia de un gran número de especies con tamaños diferentes y agregación de partículas. En general la muestra no es homogénea ni es apta para cristalización de proteínas. Sin embargo, el análisis de distribución de tamaño de partículas revela que los diámetros de las VLPs ensambladas varían poco, es decir presentan una distribución monodispersa (menor al 20%); en contraste, las partículas de microagregados, que son de mayor tamaño a las VLPs, presentan una distribución que es polidispersa (mayor al 20%).

La determinación del tamaño de las partículas contenidas en las muestras dializadas a pH 7.4 (PBS) en varios ensayos no fue consistente, ya que se agregaron visiblemente desde las primeras 12 h de diálisis y además este efecto se acelera en los primeros 5 minutos en que se inicia el análisis en el dispersor de luz. En especial, en la proteína R4A300, la agregación es más rápida en comparación con la proteína silvestre. En consecuencia, entre menor es el tiempo entre el final del proceso de diálisis y la medición en el dispersor se logran mediciones más aproximadas a los datos previamente reportados para la proteína VP2 silvestre.

De lo anterior resaltamos que la micro y macroagregación de las proteínas, a pH 7.4, parece depender del tiempo, de la agitación y de la temperatura, pues las muestras recuperadas de la diálisis que se almacenan a 4°C o 25°C se agregan por igual. Así

también las muestras microfiltradas con filtro de poro de 0.22 μm se agregan más rápido que muestras no microfiltradas. Cabe destacar que es posible que estos efectos se deban en parte al método como se prepara el PBS, pues si la concentración de sus componentes varia, las muestras presentan una distribución polidispersa del tamaño de partícula (Datos no mostrados). Sin embargo con otra composición de PBS es posible obtener muestras en donde las VLPs tardan más tiempo en agregarse (Datos no mostrados).

En el caso de las muestras dializadas a pH 4.0, el tamaño de partícula de los intermediarios de ensamble para la proteína VP2 silvestre fue de 15.09 nm (SD \pm 1.247), para la proteína R4A265 fue de 18.38 nm (SD \pm 3.096) y para la proteína R4A300 el tamaño es de 15.75 (SD \pm 1.34) (**Fig. 18**). Es importante mencionar que las partículas generadas con la proteína R4A265 están en el límite inferior de lo que podrían ser VLPs del parvovirus B19, por lo que es posible que se estén asociando o que la presencia del fragmento heterólogo en esa asa produzca un capsómero expandido de mayor diámetro que el observado para la proteína silvestre y la R4A300. Las condiciones del ensamble a pH 4.0, parecen ser favorables para la formación y estabilización de estos intermediarios pues su distribución de tamaño es monodispersa. Aunque en la muestra se presentan partículas de mayor tamaño, solo se mencionaron los anteriores pues representan más del 90% de la masa de la muestra.

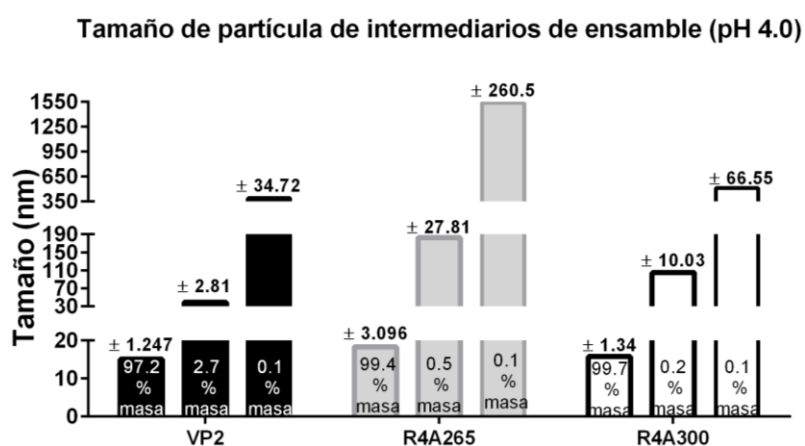


Fig. 18. Distribución de tamaño de partícula en muestras de VP2 y proteínas quiméricas dializadas durante 36 h en acetatos (20 mM) a pH 4.0, y microfiltradas con poro de 0.22 μm . Las barras negras representan el tamaño de las partículas encontradas en la muestra de la proteína VP2 silvestre, las barras grises corresponden a la proteína R4A265 y las barras blancas a la proteína R4A300. Los números sobre las barras indican las desviaciones estándar (SD) para cada distribución de tamaño de partícula; y los números dentro el porcentaje en masa de cada especie presente en la muestra. Datos obtenidos del análisis por DDL de tamaño por volumen.

En el afán de lograr obtener muestras más estables y transparentes, ideales para ser analizadas por DDL, se encontró que los intermediarios de VLPs replegados en una solución de pH 4.0 (0 mM de NaCl, 50 mM de acetatos), al resuspenderse vigorosamente a través de la aguja de una jeringa y ser microfiltradas (poro de 2 y poro de 0.2 μm) son capaces de formar partículas de 30 a 40 nm y partículas mayores de 100 nm; sin embargo, una vez iniciado el proceso de asociación se forman los macroagregados. La asociación de proteínas virales en macroestructuras es posible en condiciones en ausencia de sal, debido a que en esa situación la fuerza iónica depende de la concentración del amortiguador (Lavelle et al, 2009); así que al aumentar la concentración del amortiguador de acetatos la fuerza iónica podría haber aumentado y otras interacciones podrían haberse producido. Este fenómeno es congruente con los reportes previos para la proteína VP2, en donde se observó que al aumentar la fuerza iónica se promueve el ensamblado de VLPs e intermediarios de varios tamaños (Sánchez-Rodríguez et al., 2012).

También se observó, para las proteínas quiméricas y la proteína silvestre, un efecto de formación de partículas de 30 a 40 nm y microagregados a pH 7.4 cuando las concentraciones de los componentes del PBS no fueron precisas (Datos no mostrados). Sin embargo por la presencia de proteínas contaminantes estos ensayos deben ser repetidos con proteína más pura para descartar posibles artefactos.

La centrifugación y microfiltración realizadas en las muestras permitieron obtener una solución transparente que es recomendable para el análisis de tamaño de partícula por DDL. Sin embargo, una gran cantidad de proteína se retuvo dentro de los filtros, por lo que se recupera poca proteína soluble a pH 7.4 (**Tabla. 4**).

Tratamiento	VLPs	VP2 (pH 7.4)	R4A265 (pH 7.4)	R4A300 (pH 7.4)	VP2 (pH 4.0)	R4A265 (pH 4.0)	R4A300 (pH 4.0)
Proteína desnaturalizada		0.501 100 %	0.508 100%	0.510 100%	0.501 100%	0.508 100%	0.510 100%
Proteína soluble (Diálisis)		0.2883 57.545 %	0.4004 78.81 %	0.3468 68.00 %	0.4090 81.68 %	0.4958 97.60 %	0.4934 96.74 %
Proteína soluble (Centrifugación 10000 rpm)		0.1980 39.52 %	0.2799 55.10	0.2916 57.17 %	0.3983 79.50 %	0.4752 93.54 %	0.4596 90.11 %
Proteína soluble (Filtro poro 2 μm)		0.1935 38.62 %	0.2450 48.22 %	0.1357 26.61 %	0.3450 68.86 %	0.4255 83.76 %	0.4317 84.64 %
Proteína soluble (Filtro poro 0.22 μm)		0.0439 8.76 %	0.1036 20.39 %	0.0775 15.19 %	0.3169 63.25 %	0.4013 79.00 %	0.3849 75.47 %

Tabla. 4. Porcentaje de proteína soluble VP2, R4A265 y R4A300, recuperado de la diálisis al equilibrio y de la microfiltración (filtro con poro de 0.22 μm). Cuantificación de proteína realizada por el método de BCA-Cu⁺⁺. Datos de concentración (mg/mL) a pH 7.4, extrapolados de las absorbencias de una curva patrón de albúmina ($y = 0.7177x - 0.0158$, $R^2 = 0.9961$). Datos a pH 4.0, extrapolados de las absorbencias de una curva patrón de albúmina ($y = 0.4826x - 0.0143$, $R^2 = 0.9904$).

Parece que en parvovirus B19 como en otros virus relacionados las mutaciones en asas cercanas al eje de orden 5 afectan el ensamblado de VLPs (Brown et al., 1994. Kawase et al., 1995; DiPrimio et al., 2008). En el virus diminuto del ratón (MVM) mutaciones puntuales (sustitución de treonina por serina) en las asa 1 (aa 65-72 de B19) producen bajas cantidades de VLPs y se afecta su estabilidad, aunque modificaciones en el asa 2 (aa 195-199 de B19) si permiten el ensamblado (Carreira et al., 2004); en AAV-2 la modificación de ciertos regiones de la conservada asa HI (aa 460-479 de B19) afectan la producción de cápsides, en tanto que la delección total del asa genera solo monómeros (DiPrimio et al., 2008). Estas observaciones sugieren que las asas próximas al eje de orden 5, indirectamente podrían participar en la estabilización del ensamblado; pero además la estabilidad también depende de mantener las interacciones entre residuos polares y no polares entre las asas y sus residuos próximos (Pulicherla et al., 2012).

En el caso de las asas de parvovirus B19 que se encuentran en el eje de orden 3, en nuestros resultados parece que en esta región de las VLPs se toleran las inserciones de grandes péptidos. En particular para la proteína modificada en el asa 265-271 (R4A265) la inserción no afecto significativamente el ensamblado pues por DDL se detectaron similares porcentajes de partículas ensambladas, aunque en el análisis de selección de asas se encontró que algunos de estos residuos si presentaban contactos.

Sin embargo en los ensayos realizados para las proteínas modificadas en el asa 300-314 (R4A300), para el ensamblado de VLPs se requiere de la presencia de la proteína silvestre. Se esperaba que la capacidad de ensamblado para esta proteína fuera similar al de VP2 pues parecen no existir contactos con asas vecinas, aunque realmente no se conoce la estructura del asa; así que posiblemente las interacciones entre esta y el solvente externo sean más complejas de lo que se cree. Sin embargo este último resultado no es definitivo pues se preparaba PBS (pH 7.4) para cada ensayo y es posible que diferencias en la composición de esta solución afectaran las condiciones del ensamblado; ya que este proceso en otras proteínas de cápside viral, es espontáneo en soluciones acuosas sí la concentración de proteína es suficientemente alta y sí las condiciones de fuerza iónica, acidez (pH) y temperatura son las adecuadas (Palucha et al., 2005; van der Schoot & Zandi, 2007).

8.4.2 DENSIDAD DE LAS PARTÍCULAS: GRADIENTE DE CLORURO DE CESIO (CsCl)

Para continuar con la caracterización de las proteínas quiméricas R4A265 y R4A300, se realizó el aislamiento de las VLPs por la técnica de gradientes de cloruro de cesio.

La densidad de las partículas ensambladas a pH 7.4 a partir de la proteína VP2 silvestre fue de 1.27 g/mL, mientras que para la proteína R4A265 fue de 1.27 g/mL, para la R4A300 fue de 1.26 g/mL. Para la combinación de la proteína VP2 y R4A300 en una proporción 1:1 la densidad fue de 1.28 g/mL y para la proporción 10:1 fue de 1.27 g/mL. En el gradiente realizado a pH 4.0 la densidad de los intermediarios recuperados fue de: 1.12 g/mL (VP2), 1.22 g/mL (R4A265), 1.22 g/mL (RA4300), 1.23 g/mL (VP2-R4A300, 1:1) y 1.22 g/mL (VP2-R4A300, 10:1) (**Fig. 19**).

Como previamente se había reportado que la densidad de las VLPs ensambladas a pH 7.4 corresponde a 1.29 g/mL y de los intermediarios de 1.22 g/mL (Kaufmann et al., 2004; Sánchez-Rodríguez et al., 2012), el encontrar valores diferentes en las bandas de proteína recuperada sugiere que las leves diferencias entre densidades obtenidas, se debe a la variación en la preparación de los gradientes, ya que se ha reportado que la solvatación y asociación del CsCl es diferente según el pH de la solución y la temperatura (Ellis et al., 1975; Ifft J, 1976; Huhti et al., 2010).

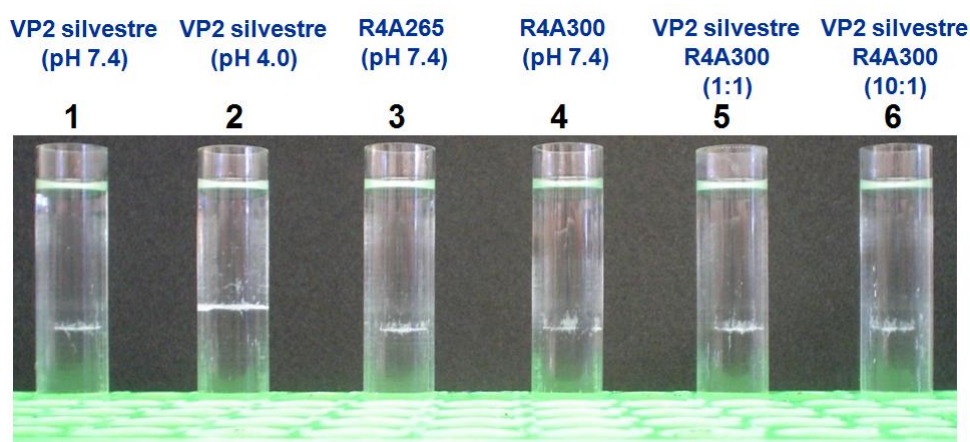


Fig.19. Densidad de las partículas ensambladas a partir de la proteína VP2, R4A265 y R4A300 (pH 7.4). Gradientes de densidad de CsCl. Tubo 1. Proteína VP2 silvestre (pH 7.4) con una densidad de 1.27 mg/mL; Tubo 2. Proteína VP2 silvestres (pH 4.0) con una densidad de 1.12 mg/mL; Tubo 3. Proteína R4A265 (pH 7.4) con una densidad de 1.27 mg/mL. Tubo 4. Proteína R4A300 (pH 7.4) con una densidad de 1.26 mg/mL. Tubo 5. Combinación VP2 silvestres –R4A300 (1:1) con una densidad de 1.28 mg/mL. Tubo 6. Combinación VP2 silvestres R4A300 (10:1) con una densidad de 1.27 mg/mL.

Los resultados del análisis por DDL y por gradientes de CsCl, indicaron la presencia de partículas de 18 y hasta 30 nm (diámetro) en las muestras dializadas de la mezcla (1:1) de VP2 con R4A300 (pH 7.4), que sugiere la coexistencia de intermediarios de ensamble y cápsidas completamente formadas. En contraste, las proteínas R4A265 y la proteína VP2 silvestre bajo las mismas condiciones de ensamblado producen mayoritariamente VLPs completas de similar tamaño.

Para las muestras donde se combinó la proteína silvestre con la proteína VP2-R4A300, se recuperó la banda de proteínas con densidad de 1.28 y 1.27 g/mL; y al correr un gel de acrilamida en condiciones desnaturizantes se encontraron 2 bandas correspondientes a VP2 silvestre y R4A300, identificadas por su peso molecular. Posiblemente en esta densidad se localizan VLPs formadas sólo por la proteína VP2, VLPs formadas sólo con R4A300, o VLPs formadas con ambas proteínas (datos no mostrados). Consideramos que esta última opción es la más factible. Es probable que los intermediarios de R4A300 formados durante la diálisis se hayan ensamblado en VLPs durante la formación del gradiente de CsCl, debido a que las condiciones de solvente son diferentes. Esto último sugiere que posiblemente se presente un efecto de impedimento estérico transitorio entre las proteínas de R4A300 o que esta modificación desestabilizó asas vecinas, ambas situaciones podrían evitar la asociación de monómeros. Sin embargo es conveniente realizar estudios de dicroísmo circular para verificar si existe algún cambio en la proporción de estructuras secundarias que pudiera afectar el ensamblado.

8.4.3 EFECTO DEL GuHCl EN EL DESENSAMBLE DE LAS VLPs

La estabilidad de las VLPs ensambladas frente a la desnaturalización química fue probada al adicionar el agente caotrópico GuHCl a las VLPs formadas. Este agente interacciona con regiones hidrófobas de diferentes partes de la proteína y al aumentar su concentración estabiliza los estados desnaturalizados por facilitar la solvatación de superficies no polares (England & Haran, 2011).

El efecto de 0.5 M y 1.0 M de GuHCl, en las muestras microfiltradas de VLPs ensambladas con proteína VP2, R4A265 o R4A300 (dializadas 36 h en PBS, pH 7.4), es idéntico y consiste en una disgregación de los microagregados, predominando dentro de los primeros 15 minutos cápsidas de entre 22 y 30 nm, pero cuyas

distribuciones de tamaño son polidispersas. Sin embargo después de 48 h las principales especies estabilizadas tienen diámetros de 16 a 18 nm, (monodisperso). En tanto que a concentraciones de 5.0 M de GuHCl, la estructura de las proteínas se desestabiliza en instantes, desplegándose rápidamente en especies de 10 a 1000 nm en menos de 5 minutos (tamaños polidispersos), que da paso a un tamaño de partícula único de aproximadamente de 0.4385 nm ($SD \pm 0.1498$) (polidispersión, Pd 3.3%) de diámetro, misma señal obtenida para las muestras de proteína desnaturizada (VP2, R4A265 y R4A300) antes del ensayo de autoensamblado. En estas mismas muestras a las 48 h de interacción con el agente caotrópico el tamaño de distribución predominante es de 0.3 nm (monodisperso) (**Fig. 20**).

Con 100 μ L de muestras recién dializadas a pH 7.4 pero sin microfiltrar, también se probó el efecto del GuHCl a una concentración de 0.0, 0.5, 1.0 y 5.0 M. A la concentración de 0.5 y 1.0 M de GuHCl para las tres proteínas se observó un efecto de desagregación en los primeros minutos de desnaturalización similar al desarrollado por las muestras microfiltradas y al volver a analizar la muestra a las 48 h se encontraron partículas con un tamaño que corresponden al de VLPs. A la concentración de 5.0 M de GuHCl en los primeros minutos se observan especies de 22, 100 y 1000 nm, estabilizándose a las 48 h en especies de aproximadamente 1000 nm (Datos no mostrados). La especie de 0.3 nm de diámetro observada en los ensayos de muestras centrifugadas y microfiltradas, se observó hasta pasadas las 48 h de iniciada la desnaturalización, posiblemente esto se deba a que en las muestras con poca proteína el efecto del GuHCl es inmediato por lo que se detecta una especie de 0.3 nm que conforma más del 90 % del volumen de la muestra.

El ensayo de desnaturalización se realizó de forma similar en muestras dializadas a pH 4.0 (sin centrifugar, ni microfiltrar), para las tres concentraciones de GuHCl, en los primeros minutos las muestras se microagregaron en partículas de 100 y 1000 nm; y al realizar el análisis de tamaño de partícula a las 48 h se encontraron partículas de 15, 30 y 1000 nm (Datos no mostrados).

A pH 7.4, la acumulación de intermediarios que se observan en los gradientes de CsCl, puede ser el resultado de condiciones que, durante la diálisis, producen altas energías de asociación que agotan el depósito de subunidades reduciendo el éxito en la formación de cápsidas completas. Este evento es predicho por algunos modelos matemáticos para los procesos de ensamble de cápsidas virales (Endres & Zlotnick,

2002; Zlotnick & Stray, 2003). Esto no explica por qué esos intermediarios no interactúan entre ellos, por lo que deben existir determinantes geométricas involucradas. Es probable que estos intermediarios sean especies relativamente estables y de tamaños tales que no pueden interactuar con otros intermediarios igualmente grandes (Katen et al., 2010). Se ha reportado que los intermediarios pequeños, o capsómeros, generados al replegar la proteína VP2 a pH 4.0, son capaces de formar VLPs al cambiar el pH a 7.0 (Sánchez-Rodríguez et al., 2012).

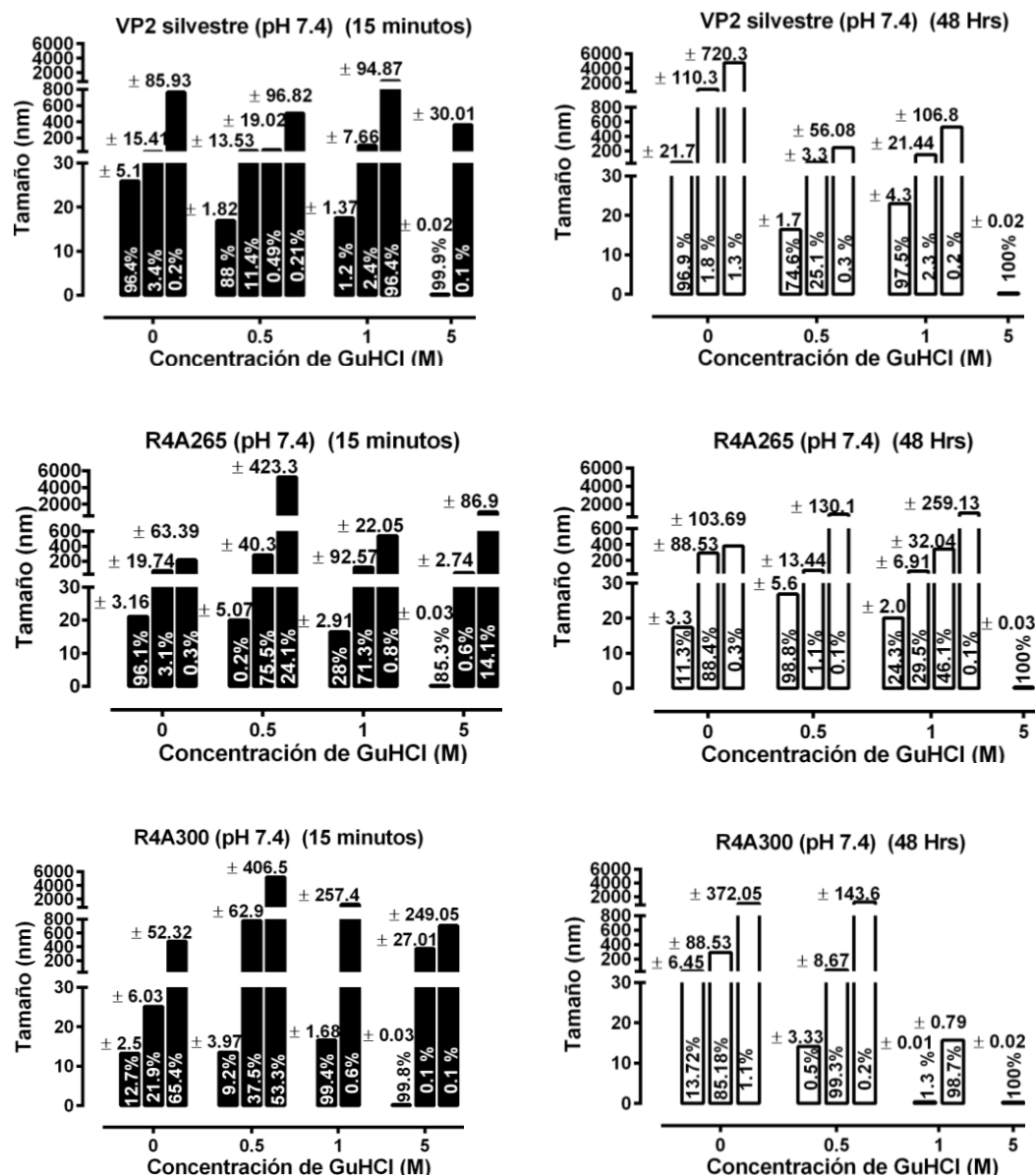


Fig. 20. Efecto del GuHCl en el desensamblaje de las VLPs de la proteína VP2, R4A265 y R4A300. Distribución de tamaño de partícula de las VLPs (PBS a pH 7.4, y microfiltradas 0.22 µm), después de adicionar 0.5, 1 o 5 M de GuHCl. Tamaño de especies obtenidas después 15 minutos de desnaturación (Gráfica del lado izquierdo), y tamaño de especies después 48 h (Gráfica del lado derecho). Los números arriba de las barras corresponden a las desviaciones estándar (SD) para cada distribución de tamaño de partícula, y los números dentro destacan el porcentaje en masa de cada especie presente en la muestra. Datos obtenidos del análisis por DDL de tamaño por volumen.

En las VLPs las interacciones proteína-proteína en la asa 265-271 son relativamente fuertes pero a la vez dinámicas, de tal forma que pueden ser selectivamente modificadas por técnicas de ADN recombinante, un atributo de utilidad para el desarrollo de herramientas innovadoras (Pease et al., 2009).

En el caso de la proteína R4A300, por la técnica de dispersión dinámica de luz parece que no se encontraron VLPs a pH 7.4, pues se detectan partículas de aproximadamente 15 nm, siendo este tamaño similar al de las partículas encontradas a pH 4.0. Sin embargo el anterior resultado no es concluyente, ya que por gradientes de cloruro de cesio en las muestras dializadas es posible recuperar una banda de proteína que tiene una densidad cercana a la reportada para las VLPs de parvovirus B19.

La rápida agregación de las muestras de la proteína silvestre y quiméricas a pH 7.4 y la variación del tamaño de partícula detectada por DDL en los diferentes ensayos realizados, producen una caracterización parcial de las VLPs. Es conveniente complementar estos resultados por técnicas como dicroísmo circular y microscopia electrónica.

9 CONCLUSIONES PRELIMINARES

- Las proteínas VP2-His modificadas en las asas 265-271 o 300-314 con la región antigénica 4 de la proteína F del VSR, forman cuerpos de inclusión cuando son expresadas en *E. coli*. El rendimiento de recuperación por cromatografía de afinidad en condiciones desnaturizantes es similar al reportado para la proteína VP2 silvestre (40 mg/ L de cultivo).
- El ensamble *in vitro* de VLPs quiméricas es posible al realizar una diálisis al equilibrio a partir de proteína solubilizada en GuHCl 5 M. En amortiguador PBS a pH 7.4 se obtiene de la proteína quimérica R4A265 VLPs de tamaño entre 22.49 nm (SD \pm 5.84) a 23.51 nm (SD \pm 8.13), mientras que para la proteína R4A300 las VLPs son de 16.85 nm (SD \pm 2.43) a 29.45 nm (SD \pm 6.03) de diámetro; estos son tamaños similares al de VLPs de proteína VP2 silvestre (22.76 nm (SD \pm 1.786) a 27.13 nm (SD \pm 5.29)).
- Las VLPs de las proteínas quiméricas presentan una estabilidad similar a la proteína silvestre, cuando interaccionan con el desnaturizante GuHCl (0.5, 1.0 y 5.0 M). Con 0.5 M de GuHCl, se disocian las VLPs silvestres y quiméricas que se ensamblaron a pH 7.4 en PBS. Mientras que al aumentar la concentración de GuHCl la desnaturización es completa e inmediata.
- Con los datos obtenidos podemos afirmar que parte de la hipótesis planteada es verdadera dado que en la proteína VP2 las asas superficiales correspondientes a los residuos 265-271 y 300-314 son sitios permisibles de ser modificados; en estas estructuras fue posible exponer péptidos hacia la superficie de la proteína sin alterar la capacidad de formación de VLPS quiméricas.
- La exposición de la región antigénica 4 de la proteína F del VSR en las asas de la proteína VP2, no eliminó la competencia de estas quimeras para formar VLPs. Sin embargo los datos obtenidos sugieren que la proteína R4A300 podría no estar formando VLPs estables, debido a la gran cantidad de intermediarios de ensamble encontrados y que los tamaños de estas partículas son polidispersos.

10 PERSPECTIVAS

- Evaluar la estabilidad de las VLPs de proteínas R4A300 y R4A265 frente al aumento de temperatura y frente a agentes desestabilizadores como SDS.
- Realizar ensayos de análisis de estructura de las proteínas R4A265 y R4A300 por difracción circular.
- Estudiar el ensamble de las VLPs quiméricas en solución PBS con diferentes concentraciones de fosfatos, para determinar qué proporción podría evitar la microagregación.
- Estudiar la capacidad de estas asas para la incorporación de fragmentos de proteína con comportamiento de unidad de plegamiento autónomo, como son algunos dominios estructurales conocidos.
- Probar las propiedades inmunogénicas de las VLPs quiméricas al realizar ensayos en modelos *in vivo* para obtener anticuerpos neutralizantes contra la región 4 del virus sincicial respiratorio.

11 REFERENCIAS

- Abrescia N, Bamford D, Grimes J & Stuart D. 2012. Structure Unifies the Viral Universe. *Annu. Rev. Biochem.* 81: 795-822
- Agbandje-McKenna M, Llamas-Saiz L, Wang F, Tattersall P & Rossmann M. 1998. Functional implications of the structure of the murine parvovirus, minute virus of mice. *Structure.* 6(11):1369-1381
- Albrecht M. 2007. Review. Supramolecular chemistry—general principles and selected examples from anion recognition and metallosupramolecular chemistry. *Naturwissenschaften* 94(12): 951-966
- Amexis G & Young N. 2006. Brief Report. Parvovirus B19 Empty Capsids as Antigen Carriers for Presentation of Antigenic Determinants. *J. Infect. Dis.* 194(6):790-794
- Auerbach M, Brown K, Kaplan A, De Las Nueces D & Singh I. 2006. A Small Loop in the Capsid Protein of Moloney Murine Leukemia Virus Controls Assembly of Spherical Cores. *J. Virol.* 80(6):2884-2893
- Ausar S, Foubert T, Hudson M, Vedvick T & Middaugh C. 2006. Conformational stability and disassembly of Norwalk virus-like particles. Effect of pH and temperature. *J. Biol. Chem.* 281(28):19478-88
- Bachmann M & Dyer M. 2004. Therapeutic vaccination for chronic diseases: A new class of drugs in sight. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 3(1): 81–88
- Bartlow P, Uechi G, Cardamone J, Sultana T, Fruchtl M, Beitle R & Ataii M. 2011. Identification of native Escherichia coli BL21 (DE3) proteins that bind to immobilized metal affinity chromatography under high imidazole conditions and use of 2D-DIGE to evaluate contamination pools with respect to recombinant protein expression level. *Protein. Expres. Purif.* 78(2):216–224
- Bembridge G, Rodríguez N, García-Beato R, Nicolson C, Melero J & Taylor G. 2000. DNA encoding the attachment (G) or fusion (F) protein of respiratory syncytial virus induces protection in the absence of pulmonary inflammation. *J. Gen. Virol.* 81: 2519-2523
- Blanco J, Boukhalova M, Shirey K, Prince G & Vogel S. 2010. New Insights for Development of a Safe and Protective RSV Vaccine. *Hum. Vaccin.* 6(6):482–492
- Brown C, Welling S, Feulbrief M, Van Lent J & Spaan W. 1994. Chimeric Parvovirus B19 capsids for the presentation of foreign epitopes. *Virology.* 198(2):477-488
- Calder L, Gonzalez-Reyes L, García-Barreno B, Wharton S, Skehel J, Wiley D & Melero J. 2000. Electron Microscopy of the Human Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein and Complexes That It Forms with Monoclonal Antibodies. *Virology.* 271(1):122-131
- Carreira A, Menendez M, Reguera J, Almendral J & Mateu M. 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
- Chaiwatpongsakorn S, Epanand R, Collins P, Epanand M & Peeples M. 2011. Soluble Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein in the Fully Cleaved, Pretriggered State Is Triggered by Exposure to Low-Molarity Buffer. *J. Virol.* 85(8): 3968–3977
- Chen C, Saxena R & Wei G. 2010. A Multiscale Model for Virus Capsid Dynamics. Hindawi Publishing Corporation International. *Int. J. Biomed. Imaging.* 2010:308627
- Chi E, Krishnan S, Randolph T & Carpenter J. 2003. Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in non-native protein aggregation. *Pharm. Res.* 20(9):1325-1336
- Chuan Y, Fan Y, Lua L & Middelberg A. 2010. Virus assembly occurs following a pH or Ca²⁺-triggered switch in the thermodynamic attraction between structural protein capsomeres. *J. R. Soc. Interface.* 7(44): 409–421
- Dance I. 2003. What is supramolecular? *New J. Chem.* 27:1–2

- DiPrimio N, Asokan A, Govindasamy L, Agbandje-McKenna M & Samulski R. 2008. Surface loop Dynamics in Adeno-Associated Virus Capside Assembly. *J. Virol.* 82(11): 5178-5189
- Dundr M, McNally J, Cohén J & Misteli T. 2002. Quantitation of GFP-fusion proteins in single living cells. *J. Struct. Biol.* 140 (1-3): 92-99
- Ekman A, Hokynar K, Kakkola L, Kantola K, Hedman L, Bondén H, Gessner M, Aberham C, Norja P, Miettinen S, Hedman K & Söderlund-Venermo M. 2007. Biological and Immunological Relations among Human Parvovirus B19 Genotypes 1 to 3. *J. Virol.* 81(13): 6927–6935
- Ellis D, Coffman V & Ifft J. 1975. The buoyant titration of native and carbamylated bovine serum mercaptalbumin. *Biochemistry.* 14 (6):1205-1210
- Endres D & Zlotnick A, 2002; Model-based analysis of assembly kinetics for virus capsids or other spherical polymers. *Biophys J.* 83(2):1217-1230
- England J & Haran G. 2011. Role of Solvation Effects in Protein Denaturation: From Thermodynamics to Single Molecules and Back. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 62: 257-77
- Empey K, Peebles S & Kolls J. 2010. Pharmacologic Advances in the Treatment and Prevention of Respiratory Syncytial Virus. *Clin. Infect. Dis.* 50(9):1258–1267
- FATCAT.
Servidor en línea. <http://fatcat.burnham.org/fatcat/>
Consultado por última vez el 8 abril de 2013. 10:00 pm.
- Fischlechner M & Donath E. 2007. Viruses as Building Blocks for Materials and Devices. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 46(18):3184–3193
- Graham B. 2010. Biological challenges and technological opportunities for respiratory syncytial virus vaccine development. *Immunol. Rev.* 239(1):149-166
- Grgacic E & Anderson D. 2006. Virus-like particles: Passport to immune recognition. *Methods.* 40(1):60-65
- Harrison S. 2001. The familiar and the unexpected in structures of icosahedral viruses. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 11(2):195–199
- Heegaard E & Brown K. 2002. Human Parvovirus B19. *Clin. Microbiol. Rev.* 15(3):485–505
- Hicks S, & Henley C. 2006. Irreversible growth model for virus capsid assembly. *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft. Matter. Phys.* 74:031912-1
- Hu X, Wang H, Ke H & Kuhlman B. 2007. High-resolution design of a protein loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104(45):17668–17673
- Hueffer K & Parrish C. 2003. Parvovirus host range, cell tropism and evolution. *Curr Opin Microbiol.* 6(4): 392-398
- Huhti L, Blazevic V, Nurminen K, Koho T, Hytönen V & Vesikari T. 2010. A comparison of methods for purification and concentration of norovirus GII-4 capsid virus-like particles. *Arch Virol.* 155(11):1855-1858
- ICTVdB, 2010.
Página electrónica. <http://www.ictvdb.org/ICTVdB/01.048.2.01.001.htm>
Consultado el 24 de noviembre de 2010. 12:30 PM
- ICTV. 2013.
Página electrónica. <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2012>
Consultado el 8 de abril de 2013. 10:55 PM
- Ifft J. 1976. Sedimentation equilibrium of proteins in density gradients. *Biophys Chem.* 5(1-2):137-157
- Johnson J. 1996. Functional implications of protein-protein interactions in icosahedral viruses. *Review. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(1): 27-33

- Katen S & Zlotnick A. 2009. The Thermodynamics of Virus Capsid Assembly. *Methods. Enzymol.* 455:395–417
- Katen S, Chirapu S, Finn M & Zlotnick A. 2010. Trapping of hepatitis B virus capsid assembly intermediates by phenylpropenamide assembly accelerators. *ACS Chem Biol.* 5(12):1125-1136
- Kaufmann B, Chipman P, Kostyuchenko V, Modrow S & Rossmann M. 2008. Visualization of the Externalized VP2 N Termini of Infectious Human Parvovirus B19. *J. Virol.* 82(15):7306–7312
- Kaufmann B, Simpson A & Rossmann M. 2004. The structure of human parvovirus B19. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101(32): 11628–11633
- Kawase M, Momoeda M, Young N & Kajigaya S. 1995. Modest truncation of the major capsid protein abrogates B19 parvovirus capsid formation. *J Virol.* 69(10):6567-6571
- Kim S, Jang J, Yu J & Chang J. 2010. Single mucosal immunization of recombinant adenovirus-based vaccine expressing F1 protein fragment induces protective mucosal immunity against respiratory syncytial virus infection. *Vaccine* 28(22):3801-3808
- Kerr J, Cotmore S, Bloom M, Linden R, & Parrish C. 2006. *Parvoviruses.* Ed. Oxford University Press Inc. New York, USA. pág: 39-41,107-121
- Lavelle L, Gingery M, Phillips M, Gelbart W, Knobler C, Cadena-Nava- R, Vega-Acosta J, Pineda-Torres L & Ruiz-Garcia J. 2009. Phase Diagrama of Self-assembled Viral Capsid Protein Polymorphs. *J. Phys. Chem. B.* 113(12): 3813-3819
- Luque A, Zandi R & Reguera D. 2010. Optimal architectures of elongated viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107(12): 5323-5328
- Mannige R & Brooks CL III. 2008. On the Tiling Nature of Virus Capsids and the Role of Topological Constraints In Natural Capsid Design. *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft. Matter. Phys.* 77:051902
- Martín D, Calder L, García-Barreno B, Skehel J & Melero J. 2006. Sequence elements of the fusion peptide of human respiratory syncytial virus fusion protein required for activity. *J Gen Virol.* 87:1649–1658
- McLellan K, Money C, Yeo P & Bhella D. 2007. The 24-Angstrom structure of respiratory syncytial virus nucleocapsid protein-RNA decameric rings. *J. Virol.* 81(17):9519–9524
- McLellan J., Chen M, Kim A, Yang Y, Graham B & Kwong P. 2010. Structural basis of respiratory syncytial virus neutralization by motavizumab. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17(2):248-250
- McLellan J, Yang Y, Graham B & Kwong P. 2011. Structure of Respiratory Syncytial Virus Fusion Glycoprotein in the Postfusion Conformation Reveals Preservation of Neutralizing Epitopes. *J. Virol.* 85(15): 7788–7796
- McLellan J, Chen M, Joyce M, Sastry M, Stewart-Jones G, Yang Y, Zhang B, Chen L, Srivatsan S, Zheng A, Zhou T, Graepel K, Kumar A, Moin S, Boyington J, Chuang G, Soto C, Baxa U, Bakker A, Spits H, Beaumont T, Zheng Z, Xia N, Ko S, Todd J, Rao S & Graham B. 2013. Structure-Based Design of a Fusion Glycoprotein Vaccine for Respiratory Syncytial Virus. *Science.* 342: 592-598
- Mellado M, Mena J, López A, Ramírez O, Carrondo M, Palomares L & Alves P. 2009. Impact of Physicochemical Parameters on In Vitro Assembly and Disassembly Kinetics of Recombinant Triple-Layered Rotavirus-Like Particles. *Biotechnol. Bioeng.* 104(4):674-686.
- Miyamoto T, Yokoyama M, Kono K, Shioda T, Sato H & Nakayama E .2011. A Single Amino Acid of Human Immunodeficiency Virus Type 2 Capsid Protein Affects Conformation of Two External Loops and Viral Sensitivity to TRIM5 α . *PLoS ONE* 6(7): e22779
- Munday D, Emmott E, Surtees R, Lardeau C, Wu W, Duprex W, Dove B, Barr J & Hiscox J. 2010. Quantitative Proteomic Analysis of A549 Cells Infected with Human Respiratory Syncytial Virus. *Mol. Cell. Proteomics.* 9(11):2438-2459.

- NCBI, 2010. Base de datos:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?Dopt=s&uid=28920>
Consultado el 30 de agosto de 2010. 5:02 PM.
- Nilsson J, Miyazaki N, Xing Li, Wu B, Hammar L, Cheng T, Takeda N, Miyamura T & Cheng R. 2005. Structure and Assembly of a T=1 Virus-Like Particle in BK Polyomavirus. *J Virol.* 79(9): 5337–5345
- Noad R & Roy P. 2003. Virus-like particles as immunogens. *Trends. Microbiol.* 11(9):438-444.
- Palucha A, Loniewska A, Satheshkumar S, Boguszezewska-Chachulska A, Umashankar M, Milner M, Haenni A & Savithri H. 2005. Virus-like particles: models for assembly studies and foreign epitope carriers. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* 80:135-68
- Panchenko A & Madej T. 2005. Structural similarity of loops in protein families: toward the understanding of protein evolution. *BMC Evol. Biol.* 5:10
- Pattenden L, Middelberg A, Niebert M & Lipin D. 2005. Towards the preparative and large-scale precision manufacture of virus-like particles. *Trends. Biotechnol.* 10:523–529.
- Pease III L, Lipin D, Tsai D, Zachariah M, Lua L, Tarlov M & Middelberg A. 2009. Quantitative Characterization of Virus-like Particles by Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation, Electrospray Differential Mobility Analysis, and Transmission Electron Microscopy. *Biotechnol. Bioeng.* 102(3):845-855
- Pokkuluri P, Raffin R, Dieckman L, Boogaard C, Stevens F, & Schiffer M. 2002. Increasing protein stability by polar surface residues: domain-wide consequences of interactions within a loop. *Biophys. J.* 82(1): 391–398.
- Prevelige P, Thomas D, & King J. 1993. Nucleation and growth phases in the polymerization of coat and scaffolding subunits into icosahedral procapsid shells. *Biophys. J.* 64(3):824-835
- Prevelige P. 1998. Inhibiting virus-capsid assembly by altering the polymerisation pathway. *Trends. Biotechnol.* 16(2):61-65
- Pulicherla N, Kota P, Dokholyan N & Asokan A. 2012. Intra- and Inter-Subunit Disulfide Bond Formation Is Nonessential in Adeno-Associated Viral Capsids. *PLoS ONE* 7(2): e32163
- Ros C, Gerber M, & Kempf C. 2006. Conformational Changes in the VP1-Unique Region of Native Human Parvovirus B19 Lead to Exposure of Internal Sequences That Play a Role in Virus Neutralization and Infectivity. *J. Virol.* 80(24): 12017–12024
- Rossmann M & Johnson J. 1989. Icosahedral RNA virus structure. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 533-573
- Ruvinsky A & Vakser I. 2010. Sequence composition and environment effects on residue fluctuations in protein structures. *J. Chem. Phys.* 133 (15):155101
- Sánchez-Rodríguez S, Münch-Anguiano L, Echeverría O, Vázquez-Nin G, Mora-Pale M, Dordick J & Bustos-Jaimes I. 2012. Human parvovirus B19 virus-like particles: In vitro assembly and stability. *Biochimie.* 94(3):870-878
- Sánchez-Rodríguez, 2012. Caracterización de partículas tipo virus de la proteína VP2. Tesis de doctorado. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México. Pág. 75-76, 91-93
- Sedlik C, Dridi A, Deriaud E, Saron F, Rueda P, Sarraseca J & Casal J. 1999. Intranasal Delivery of Recombinant Parvovirus-Like Particles Elicits Cytotoxic T-Cell and Neutralizing Antibody Responses. *J. Virol.* 73(4):2739–2744
- Servant-Delmans A, Lefrere J, Morinet F & Pillet S. 2010. Advances in human B19 erythrovirus biology. *J. Virol.* 84(19): 9658- 9665
- Shehu A & Kavraki L. 2012. Modeling Structures and Motions of Loops in Protein Molecules. *Entropy.* 14(2):252-290

- Smith B, Lawrence M & Colman P. 2002. Modelling the structure of the fusion protein from human respiratory syncytial virus. *Protein. Eng.* 15(5):365-371
- Steven A, Trus B, Booy F, Cheng N, Zlotnick A, Caston J & Conway J. 1997. The making and breaking of symmetry in virus capsid assembly: glimpses of capsid biology from cryoelectron microscopy. *FASEB J.* 11(10): 733-742
- Swanson K, Settembre C, Shaw C, Dey A, Rappuoli R, Mandl C, Dormitzer P & Carfi A. 2011. Structural basis for immunization with postfusion respiratory syncytial virus fusion F glycoprotein (RSV F) to elicit high neutralizing antibody titers. *PNAS.* 108(23): 9619–9624
- Sweeney B, Zhang T, & Schwartz R. 2008. Exploring the Parameter Space of Complex Self-Assembly through Virus Capsid Models. *Biophys. J.* 94(3): 772–783
- Tokuriki N, Oldfield C, Uversky V, Berezovsky I & Tawfik D. 2008. Do viral proteins possess unique biophysical features? *Trends. Biochem. Sci.* 34(2): 53-59
- Tripp R. 2004. Pathogenesis of Respiratory Syncytial Virus Infection. *Viral. Immunol.* 17(2):165-181
- Tremolada S, Delbue S, Castagnoli L, Allegrini S, Miglio U, Boldorini R, Elia F, Gordon J & Ferrante P. 2010. Mutations in the External Loops of Bk Virus Vp1 and Urine Viral Load in Renal Transplant Recipients. *J. Cell. Physiol.* 222(1):195–199
- Twarock R. 2005. The architecture of viral capsids based on tiling theory. *J. Theor. Med.* 6(2): 87–90
- Uhlenheuer D, Petkau K & Brunsveld L. 2010. Combining supramolecular chemistry with biology. *Chem. Soc. Rev.* 39(8): 2817-2826
- Van der Schoot P & Zandi R. 2007. Kinetic theory of virus capsid assembly. *Phys. Biol.* 4(4):296–304
- Vergara H, Gutiérrez M, & Mohapatra S. 2006. Biología molecular del virus sincitial respiratorio y desarrollo de estrategias profilácticas. *Salud Uninorte* 22(2): 135-153
- VIPERdb. 2010(a).
Base de datos. http://predictor.scripps.edu/info_page.php?VDB=1cwp
Consultado el 10 de noviembre de 2010. 13:10 PM.
- VIPERdb. 2010(b).
Base de datos. http://VIPERdb.scripps.edu/info_page.php?VDB=1s58
Consultado el 13 de octubre de 2010. 14:02 PM.
- Viveros-Belmonte A, 2012. Derivatización de partículas tipo virus con m-Bromobimano. Tesis de licenciatura en Química de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México. Pág.57-58.
- White R & Meirovitch H. 2006. Minimalist explicit solvation models for surface loops in proteins. *J. Chem. Theory. Comput.* 2(4):1135-1151
- Wong S, Momoeda M, Field A, Kajigaya S & Young N. 1994. Formation of empty B19 parvovirus capsids by the truncated minor capsid protein. *J. Virol.* 68:4690–4694.
- Zeltins A. 2013. Construction and Characterization of Virus-Like Particles: A Review. *Mol. Biotechnol* 53(1): 92-107
- Zhao X, Singh M, Malashkevich V & Kim P. 2000. Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:14172–14177.
- Zlotnick A & Stray S. 2003. How does your virus grow? Understanding and interfering with virus assembly. *Trends. Biotechnol.* 21(12): 536-542

12 ANEXO. SECUENCIAS Y DATOS DIVERSOS

12.1 ANÁLISIS DESARROLLADO DE LA SELECCIÓN ASAS QUE PUEDEN PERMITIR MODIFICACIONES

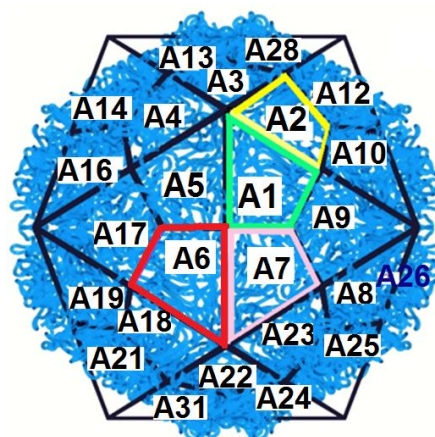


Fig. A1. Esquema de las distintas intercaras de la cápsida del Parvovirus B19. Se distinguen sólo 3 intercaras distintas: A1-A2 (verde-amarillo), A1-A7 (verde-rosa) y A1-A6 (verde-rojo). Disposición en simetría de icosaedro de las 60 subunidades (A-1 a A -60) en el arreglo T = 1 del Parvovirus B19. (Modificado de VIPERdb, 2010b).

12.1.1 COEFICIENTES B Y ASAS SUPERFICIALES QUE NO FORMAN CONTACTOS EN LAS INTERCARAS

ASA	SITUACIÓN
62-75,	Presenta los coeficientes B más altos, por lo tanto esta es móvil en el espacio y posiblemente no participe en la formación del ensamble.
134-137 giro	Se encuentra bordeando el canal del eje de orden 5, tiene coeficientes B medianos, presentaría interferencia si se modifica más de un residuo, y además sus residuos tienen participación energética en el ensamble de las intercaras A1-A2 y A2-A1.
195-199	Es vecina del asa 62-75 , también tiene coeficientes B altos, aunque sus residuos 195 y 196 tienen participación energética en el ensamble de las intercaras A1-A2. Si se modifica esta asa seguramente impactará en la formación de VLPs.
265-271	Se ubica completamente sobre otro monómero, no obstante presenta coeficientes B altos. Es vecina del asa 395-399 (la cual forma parte de una intercara). Probablemente el asa 265-271 participe en la formación del capsómero, aunque no tiene participación energética en la intercara.
300-314	En la estructura no aparece, posiblemente se mueve mucho.
357-370	Se encuentra en el centro del monómero, adyacente al asa 525-533 , y tocando el asa 265-271 de otro monómero, su coeficiente B es un poco alto.
395-399	Presentan interferencias, prácticamente está sobre la subunidad adyacente en el capsómero. Probablemente participa en la formación del capsómero, por lo que no se recomienda modificarla.
469-472 giro	Está cercana al asa 134-137 y al eje de orden 5, posiblemente podría modificarse, evitando alterar específicamente los residuos 469 y 470, ya que estos tienen participación en la intercara A1-A2.
525-533	Tiene coeficientes B altos, está adyacente a la intercara entre capsómeros y es vecina al asa 195-198 de un capsómero cercano. Los residuos 525-531 tienen participación en la intercara A2-A1, si se modifican probablemente se altere el proceso de ensamblado.

Tabla A1. Resumen del análisis de coeficientes B de las asas superficiales e interacción con asas próximas.

12.1.2 NÚMERO DE CONTACTOS EN LA FORMACIÓN DE LA CÁPSIDE (VIPER)

Residuo1-Residuo2	Tipo1-Tipo2	A1-A6 (I-2)	A1-A7 (I-3)	A1-A2 (I-5)	Residuo1-Residuo2	Tipo1-Tipo2	A1-A6 (I-2)	A1-A7 (I-3)	A1-A2 (I-5)
ALA60-ALA527	H-H			A1-A2	PHE273-ASP364	H-A		A1-A7	
SER62-GLU279	P-A		A7-A1		PHE273-LYS365	H-B		A1-A7	
SER62-HSD281	P-B		A7-A1		ARG274-ASP168	B-A		A1-A7	
LYS73-GLU279	B-A		A7-A1		ARG274-GLN356	B-P		A1-A7	
CYS75-ALA282	H-H		A7-A1		ARG274-ALA362	B-H		A1-A7	
ASP133-ILE470	A-H			A2-A1	ARG274-ASP364	B-A		A1-A7	
LYS134-THR135	B-P			A2-A1	LYS300-LEU267	B-H		A7-A1	
THR135-LYS134	P-B			A1-A2	LYS300-THR391	B-P		A7-A1	
THR135-THR135	P-P			A2-A1	LYS300-PHE393	B-H		A7-A1	
THR135-GLY137	P-H			A1-A2	LYS300-PRO394	B-H		A7-A1	
GLY137-THR135	H-P			A2-A1	GLY315-HSD390	H-B		A7-A1	
LEU267-THR299	H-P		A1-A7		PHE393-GLN404	H-P		A1-A7	
LEU267-LYS300	H-B		A1-A7		PRO394-LYS300	H-B		A1-A7	
GLY268-GLN368	H-P		A1-A7		GLY469-VAL139	H-H			A1-A2
GLY269-TYR367	H-P		A1-A7		ILE470-ASP133	H-A			A1-A2
ASP270-THR299	A-P		A1-A7		ILE470-VAL479	H-H			A1-A2
ASP270-GLN368	A-P		A1-A7		ALA527-SER58	H-P			A2-A1
PRO271-LYS365	H-B		A1-A7		ALA527-ALA60	H-H			A2-A1
PRO271-TYR367	H-P		A1-A7		ALA527-LYS202	H-B			A2-A1
LYS272-SER353	B-P		A1-A7		ALA530-GLN195	H-P			A2-A1
LYS272-GLN368	B-P		A1-A7		ALA530-LYS202	H-B			A2-A1
LYS272-VAL371	B-H		A1-A7		LYS531-GLN195	B-P			A2-A1

Tabla A2. Contactos entre residuos de las aspas de la estructura cristalográfica (1S58) de la proteína VP2 de parvovirus B19. La subunidad de intercara es formada por dos subunidades ejem., la intercara A1-A6 es formada por la subunidad A1 y A6, de tal manera que el Residuo 1 pertenece a la primera subunidad y el Residuo 2 pertenece a la segunda subunidad. Las letras identifican el tipo de subunidad y los números (1.2.3.) a la unidad asimétrica icosaédrica a la que la subunidad pertenece. Intercara(s) en las cuales está presente un contacto es identificada al listar el nombre de la intercara. El espacio en blanco indica que el contacto no está presente en la intercara. Los contactos en la intercara son coloreados basados en la icosaedro/quasi-simetría por la cual las subunidades son relacionadas: negro= no observable simetría; rojo = simetría orden 2; verde = simetría orden 3; azul = simetría orden 5. Tipo de residuo: Ácido (**A**), Básico (**B**), Hidrofóbico (**H**), Ácido Nucleico (**NA**), Polar no cargado (**P**). Modificado de la base de datos VIPERdb. (http://VIPERdb.scripps.edu/contact_table.php?VDB=1s58&layer=).

ASA	SITUACIÓN DEL ASA
62-75,	El residuo 62 tiene contactos con el residuo 279 en la intercara A7-A1, dentro del capsómero, no obstante el asa podría ser modificada (problema tolerable).
134-137 giro	Existe un estrecho contacto entre el asa con su isóloga en la intercara A1-A2 (capsómero vecino). Esta situación representa un problema serio, que imposibilitaría la modificación de esta asa.
195-199	Los contactos entre residuo 195 con los residuos 530 y 531, en intercara A1-A2, generan un problema para la modificación de secuencias que es tolerable si no se altera este contacto en particular.
265-271	El residuo 270 tiene contactos con los residuos 299 y 368 en la intercara A7-A1. Sería posible modificar esta asa siempre que se respeten estos contactos. Consideramos esto un problema tolerable. Las interacciones de contacto del residuo 271 con los residuos 365 y 367 en la intercara A7-A1 dificultan la modificación del asa correspondiente. Este es un problema tolerable, que puede ser superado si no se tocan esos residuos.
300-314	Los residuos no tienen densidad electrónica, se ubica adyacente a las asas 265-271 y 395-399 de otro monómero. Es un excelente prospecto para ser modificada.
357-370	Por otra parte los residuos 362, 364, 365, 367 y 368, tienen contactos en la intercara A7-A1. Esto sugiere que si se modifican estos residuos se presentará un problema serio.
469-472 giro	Los contactos que establecen los residuos 469 y 470 con 139 y con 133 y 479 respectivamente, en la intercara A1-A2, dificultan la modificación de esta asa, no obstante si se evita alterar estos residuos, posiblemente se puedan obtener VLPs. Representa un problema tolerable.
525-533	Los residuos 527, 530 y 531 forman 6 contactos en la intercara A2-A1. Sin embargo, consideramos que este es un problema tolerable.

Tabla A3. Resumen de los contactos entre residuos que forman las asas superficiales e interacción con residuos próximos. Para verificar los contactos se utilizó la herramienta de análisis de la base de datos VIPERdb.

12.1.3 ALINEAMIENTO ESTRUCTURAL

12.1.3.1 TAXONOMÍA DE LA FAMILIA *Parvoviridae*

Family: <i>Parvoviridae</i>	(2 Subfamilies)
Subfamily: <i>Densovirinae</i>	(4 Genera)
Genus: <i>Brevidensovirus</i>	(2 Species)
Species: <i>Aedes aegypti densovirus</i>	
Species: <i>Aedes albopictus densovirus</i>	
Genus: <i>Densovirus</i>	(2 Species)
Species: <i>Galleria mellonella densovirus</i>	
Species: <i>Junonia coenia densovirus</i>	
Genus: <i>Iteravirus</i>	(1 Species)
Species: <i>Bombyx mori densovirus</i>	
Genus: <i>Pefudensovirus</i>	(1 Species)
Species: <i>Periplaneta fuliginosa densovirus</i>	
Subfamily: <i>Parvovirinae</i>	(5 Genera)
Genus: <i>Amdovirus</i>	(1 Species)
Species: <i>Alutian mink disease virus</i>	
Genus: <i>Bocavirus</i>	(2 Species)
Species: <i>Bovine parvovirus</i>	
Species: <i>Canine minute virus</i>	
Genus: <i>Dependovirus</i>	(12 Species)
Species: <i>Adeno-associated virus-1</i>	
Species: <i>Adeno-associated virus-2</i>	
Species: <i>Adeno-associated virus-3</i>	
Species: <i>Adeno-associated virus-4</i>	
Species: <i>Adeno-associated virus-5</i>	
Species: <i>Avian adeno-associated virus</i>	
Species: <i>Bovine adeno-associated virus</i>	
Species: <i>Canine adeno-associated virus</i>	
Species: <i>Duck parvovirus</i>	
Species: <i>Equine adeno-associated virus</i>	
Species: <i>Goose parvovirus</i>	
Species: <i>Ovine adeno-associated virus</i>	
Genus: <i>Erythrovirus</i>	(4 Species)
Species: <i>Human parvovirus B19</i>	
Species: <i>Pig-tailed macaque parvovirus</i>	
Species: <i>Rhesus macaque parvovirus</i>	
Species: <i>Simian parvovirus</i>	
Genus: <i>Parvovirus</i>	(12 Species)
Species: <i>Chicken parvovirus</i>	
Species: <i>Feline panleukopenia virus</i>	
Species: <i>H-1 parvovirus</i>	
Species: <i>HB parvovirus</i>	
Species: <i>Kilham rat virus</i>	
Species: <i>Lapine parvovirus</i>	
Species: <i>Lull virus</i>	
Species: <i>Minute virus of mice</i>	
Species: <i>Mouse parvovirus 1</i>	
Species: <i>Porcine parvovirus</i>	
Species: <i>RT parvovirus</i>	
Species: <i>Tumor virus X</i>	

Fig. A2. Taxonomía completa de la familia *Parvoviridae* (Modificado del ICTV, 2013).

12.1.3.2 ALINEAMIENTO ESTRUCTURAL CON FATCAT (FLEXIBLE STRUCTURE ALIGNMENT BY CHAINING ALIGNED FRAGMENT PAIRS ALLOWING TWISTS) <http://fatcat.burnham.org/fatcat/>

| ... Structurally equivalent and identical residues
 : ... Structurally equivalent and similar residues
 Structurally equivalent, but not similar residues.
 (Structure pairs with probability < 0.05 are significantly similar)

12.1.3.2.1 1S58 CONTRA 1DNV

Align 1S58*A.pdb 523 with 1DNV*A.pdb 415
 Twists 0 ini-len 248 ini-rmsd 18.22 opt-equ 262 opt-rmsd 4.17 chain-rmsd 18.22 Score 221.51 align-len 520 gaps 258 (49.62%)
 P-value 1.44e-02 Afp-num 90296 Identity 5.58% Similarity 12.31%
 Block 0 afp 31 score 221.51 rmsd 18.22 gap 270 (0.52%)

```

Chain 1: 33 ANSVTCTFSRQFLIPYDPEHHYKVFSPAASSCHNASGKEAKVCTITPIMGYSTPWRYLDF-NALNLFPS
          1111111111111111 11111111 11 11111111111111 11111111
Chain 2: 34 KKLSTYTKSHKFMIFGL-ANNVIGPTGTGT-----TAVNRLTCLAEIPWQKLPYMNQ

Chain 1: 102 LEFQHLENIYGSIAPDALVTIASEIAVKDVTDKTGGGVQVTDSATGRCLMLVDHE--YKYPYVLGQ----
          1111111 11111111111111111111111111 11111111111111 1111111
Chain 2: 88 SEFDLLP--PGSRVVECNVKVIFRTNRIAFETSSTVTKQAT-LNQISNVQTAIGLNKLGWINRAFTAQ

Chain 1: 166 -----GQDTL-----APELP-----IWVYFPPQYAYLTVGD
          11111 11111 1111111111111111
Chain 2: 155 SDQPMIPTATTAPKYEPVTGDTGYRGMIAADYYGADSTNDTAFGNAGNYPHHQVSSFTFLQNYCYMQQTN

Chain 1: 192 VNTQGISGDSKKLASEESAIFYVLEHSSFQLLG--TGGTATMSYKFPVPPENLEGCSQHFYEMYNPLYGS
          1 111111111111111111 1111111111111111111111 1111 11
Chain 2: 225 Q-----GTGGWPCLAEHLQDFSKTVNNQCLIDVYKPKMGLIKSPLNYK---IIGQPTVKG

Chain 1: 260 RLGVPDTLGGDPKFRSLTHEDHAIQPQNFMPGPLVNSVSTKTGLSTGTSQNRISLRPGPVSQPYHHWD
          111111
Chain 2: 279 -----TISVGDNLVNMARGAVVTNPPEATQNVAESTHNLTR-----

Chain 1: 343 DKYVTGINAISHGQTTYGNAEDKEYQQGVGRFPNEKEQLKQLQGLNMHTYFPNKGTTQYTDQIERPLMV
          11
Chain 2: 314 -----NF-----

Chain 1: 413 SVNRRAL---HYESQLWSKIPNLDDSFKTQFAALGGWGLHQPPPQIFLKLPLQSGPIGGIKSMGI---T
          11111111 11111111 1111 11111111111111111111 111 1
Chain 2: 316 PADLFNIYSDIEKSQVLHK-----GPWGHENPQIQPSVHIGIQAVPALTTGALL-----INSSPLN

Chain 1: 477 TLVQYAVGIMTVMTFKLGPRKATGRWNPQ
          11111111111111111111111111111111
Chain 2: 372 SWTDSMGYIDVMSSCTVMEAQPTHFFPFSTE

```

Note: positions are from PDB; the numbers between alignments are block index

12.1.3.2.2 1S58 CONTRA 2G8G

Align 1S58_.pdb 523 with 2G8G_.pdb 524
 Twists 0 ini-len 432 ini-rmsd 2.59 opt-equ 481 opt-rmsd 3.04 chain-rmsd 2.59 Score 912.10 align-len 561 gaps 80 (14.26%)
 P-value 2.89e-15 Afp-num 117053 Identity 21.39% Similarity 34.40%
 Block 0 afp 54 score 912.10 rmsd 2.59 gap 121 (0.22%)

```

Chain 1: 19 NPVKSMWSEGATFSANSVTCTFSRQFLIPYDPEHHYKVFSPAASSCHNASGKEAKVCTITPIMGYSTPW
          1111111111111111111111111111111111111111111111111 11111111111111
Chain 2: 216 GNASGDWHCDSTWSEGHVTTTSTRTWVLPYNNHLYKRLGESL-----QSNTYNGFSTPWG

```



```

FPV      FGDIGVQODKRRGVT
AAV-2    RINTPSGTTTQSRLO
B19      DTL...LG...GDP
          [Redacted]

V9
Lali
SPV      SA          Q
RhPV     SA          Q
PtPV     SA          Q

```

Fig.A4. Alineamiento estructural de la secuencia correspondiente al asa de los residuos 265 a 271 (DTLGGDP) de parvovirus B19. En el alineamiento se observa que en AAV-2 y en otros miembros de la familia *Parvoviridae* número de residuos de interés que forman parte del asa GH (en rojo) son más que en la secuencia de B19 (Modificado de Kaufmann et al., 2004).

```

FPV      VCY SAPY.....YSFE
AAV-2    PGP CYRQORVSKTSADNNNSEYSWTCATKY
B19      PGPLVNSVSTKegdssntgagkalTGLSTG
          [Redacted]

V9
Lali
SPV      T T A      S A I
RhPV     TIT AD      A H QAFLQ
PtPV     M T T      A F

```

Fig.A5. Alineamiento estructural de la secuencia correspondiente al asa de los residuos 300-314 (KEGDSSNTGAGKALT) de parvovirus B19. En el alineamiento se observa que en AAV-2 el número de residuos de interés que forman el asa GH (en rojo) son equivalentes al número de residuos en la secuencia de B19, mientras que en FPV el número es menor (Modificado de Kaufmann et al., 2004).

ASA	SITUACIÓN DEL ASA
62-75	No hay insertos, pero esta región es mayor en el parvovirus B19.
134-137 giro	Se encuentran hasta 3 residuos adicionales en varias secuencias, parece un sitio conservado.
165-166	(Q y G) hay un inserto enorme en el parvovirus de artrópodos Densovirus (1DNV), pero esa posición en Parvovirus B19 (1S58) está bajo varias asas, por lo que cualquier inserto en esa zona quedaría oculto.
195-199	Aparece un inserto de 9 residuos entre T194 y Q195.
265-271	Inserción a nivel de familia se observó.
357-370	Se encontró un gran inserto en 2G8G, 2QA0 y 1LP3 (todos virus adeno-asociados). Casi toda la familia tiene un asa mayor en esta zona, sin embargo en esa región el alineamiento es de mala calidad.
300-314	Es más larga que AAV-2 y FPV.
395-399	El alineamiento es forzado, por lo que no podemos obtener información de dicha zona.
469-472 giro	El alineamiento es forzado aunque que parece que se puede alargar, no obstante el alineamiento no parece el mejor.
525-533	Un inserto indica que la secuencia tolera la elongación de la proteína, sin embargo las modificaciones comprometen el establecimiento de los contactos intercara.

Tabla A4. Resumen del análisis del alineamiento estructural de las asas superficiales e interacción con asas próximas.

12.2 GEN VP2, GEN F DEL VSR Y GENES QUIMÉRICOS

Secuencia con uso de codones para *E. coli*, del plásmido pET-VP2-6His que tiene el gen VP2, con una bandera de 6 histidinas (His) (Donado por la Dra. Sandra Paola Sánchez Rodríguez).

>VP2-6His

ATGACCAGTGTAAACAGTGGCGAGGCCTCAACCGGCGCTGGCGGGGTGGTTCCTCCACCGGTAAAGAGCATGTGGAG
CGAGGGCGGCACTTTTTCTGCGAATAGCGTCACTTGCACCTTCAGCCGTCATTCCTGATTCGGTATGATCCGGAGC
ACCACACTACAAAGTGTTCCTCCCGGGCGCCTTAGCTGTACAACCGCTCTGGCAAAGAAGCGAAAGTCTGCACGATC
AGCCCGATCATGGGGTATTCTACTCCATGGCGTTACCTGGATTTTAATGCACTGAACCTGTTTTTCTCCCACTGGA
ATTTTCAGCACTTAATCGAAAATTACGGTTCATTTGCACCTGACGCCTTAACAGTGACCATCAGTGAAATTGCAGTAA
AGGATGTGACGGATAAAAACGGGCGGGGTACAGGTGACGGATAGTACCACCGGCCGCTCTGTCATGTTAGTGGAT
CATGAATATAAATACCCATACGTGTTAGGGCAAGGCCAAGATACCCTGGCACCTGAGTTACCTATTTGGGTGTACTT
TCCACCTCAATACCGTCACTTACAGTCCGTTGATGTTAACACACAAGGTATCAGTGGCGATTCTAAAAGCACTGGCTA
GCGAAGAGTCCCGTTTTTACGTTCTGGAACATAGCAGTTTCCAACCTGCTGGGTACGGGTGGTACAGGACACAATGCT
TATAAATTTCCGCCGGTGGCGCGGAAAACCTGGAAGGCTGTTCCAGCATTTCTATGAAATGTATAATCCGCTGTA
TGGTAGTCGCTGGGTGTTCCGGATACGCTGGGCGGTGATCCTAAGTTTCGCAGCCTGACCCACGAAGATCACGCGA
TTCAGCCACAAAACCTTCATGCCGGGCCCTCTGGTGAACCTCTGTTTCCACAAAAGAGGGCGACTCTTCCAGTACGGGC
GCCGGCAAGCGCTGACGGTCTGTCAACCGGTACCTCACAGAACACTCGCATCAGCTTACGTCCGGGGCCGGTCTC
ACAGCCATATCACCATTGGGACACAGATAAATACGTTACCGGTATTAATGCAATCTCCCACGGCCAAACCATTATG
GTAATCCGAAGACAAGAGTACCAGCAGGGCGTGGCGCTTCCCAGAACGAAAAGAACAACCTGAAACGCTGCAG
GGGCTGAACATGCATCAGTATTTCCAAAACAAGGCCACCAACAATATACGGACAGATCGAACCGCCGCTGATGGT
AGGTTGAGTTTGGAAATCGTCGCGCCCTGCATTATGAGTACAGTTATGGTCTAAAATTTCCAAATCTGGACGATTCAT
TTAAAACCCAGTTTGCAGCACTGGGCGGTGGGGGCTGCATCAGCCGCCGCCACAGATTTTTTCTGAAAATCTTACC
CAGAGCGGGCTATTGGCGGGATTAAAAGCATGGGTATTACCACGTTAGTTGAGTATGCAAGTGGGTATTATGACTGT
TACCATGACTTTTAAACTGGGGCTGCGGAAAAGTACCAGGTCGTTGGAATCCACAGCCGGGGTATTATCCGCCGATG
CTGCTGGTCACTGTCGCTATGTCTTATATGACCCGACCGCACTGACGCCAAGCAGCATCATCGGCATGTTTTGAA
AAGCCTGAAGAGCTGTGGACTGCCAAGAGCCGTGTCCACCCTTTAGAGCACCACCACCACCACCCT

Fragmento del gen F del VSR (región 4) ensamblado por PCR (Donado M. en C. Areli Moran)

>fF-R4VSR

ACTGATGTAAGTAGTAGTGTAACTACCTAGTCTGGGAGCCATCGTGAGTTGTTACGGCAAAACCAATGTACTGCGAGTAATAAAAATCGTGGAAATAATT
AAGACTTTTTAGTAAACGGCTGTGATTACGTATCAAAATAAAGGCATGGACACCGTGAGTGTAGGAACACTCTT

Genes quiméricos sintéticos

>R4A265

CATATGACTTCTGTTAATTTCTGCGGAAGCATCTACTGGTGTGGTGGTGGTGGCTCTAACCCAGTGAAGTCCATGTGGTCTGAAGGTGCTACCTTCAGC
GCAAACTCCGTGACCTGCACCTTCAGCCGTCAGTTTCTGATTCGCTACGACCCAGAGCATCACTATAAAGTGTCTCTCCAGCTGCTTCCAGCTGTCAT
AACGCTACTGGCAAAGAGCAAAAGTTTGTACTATTTCTCCGATTATGGGCTATTTACCCTGGCGTATCTGGATTTCACGCCCTGAACTGTTC
TTTTCTCCACTGGAGTTCAGCATCTGATCGAAAATATGGCTCTATTGCTCCAGACGCACTGACCGTAACCATCTCCGAAAATCGCGGTAAAGACGTT
ACCGACAAAACCTGGTGGTGGTACAGGTTACCGATTCTACTACCGGCTGCTGTGTCATGCTGGTTGACCACGAGTACAAGTATCCATACGTAAGTGGT
CAGGGTCAGGACTCTGGTCCAGAGCTGCCGATTTGGGTGATTTTCCGCCACAGTACGCGTATCTGACTGTAGGTGACGTAACACTCAGGGTATC
TCCGGTGTATCCAAGAACTGGCTTCTGAAGAGAGCGCTTCTATGTAAGTGAACATTTAGCTTCCAGCTGCTGGGTACTGGTGGTACTGCTACCATG
AGTCAAAAATTTCCACAGGTTCCACAGAGAACCCTGGAAGGTTGTTCCAGCACTTTTACGAGATGTACAATCCGCTGTACGGTTCCTGCTGGGTGTT
CCAGTACCCTGACTGACGTTCTTCTCTGTATTACCTCTCTGGGTGCTATTGTGCTTGTATTGGCAAACCAAGTGTACTGCTTCCAAACAAGAA
CGTGGCATCATCAAACTTCAGCAACGGCTGTGATTACGTGTCTAACAAGGTATGGACACTGTTTCTGTGGGCAATACCCTGGGTGGTACCCAAAAG
TTCCGTTCTCTGACTCAGAGGATCATGCTATCCAGCCGAGAAATTTTATGCCAGGTCCTGTTAACAGCGTTTCCACAAAAGAGGTGACAGCAGC
AGCACTGGTGCAGGTAAGGCTCTGACTGGTCTGCTACCGGTACCTCTCAGAACACCCGATCTCTCTGCTCCAGGTCCAGTATCTCAGCCGTACCAC
CACTGGGACACCCGAAATAACGTTACCGGTATTAATGCAATCTCCCAGGTCAGACCACTACGGTAAATGCTGAAGACAAAAGAAATATCAGCAGGGTGTG
GGTCTTTTCCGAAACGAGAAAGAAACAGCTGAAGCCTGTCAGGCTCTGACGACTTGAACACTACTTATTTCCGAAACAAAGTACCCAGCTATCAG
ATCGAAGCTCCGCTGATGGTGGTAGCGTTTGAATCGTGTGGCTGTCAGTACGAGTCCAGCTGTGGTCTAAAATCCCAAACTGGATGACTCTTTC
AAGACTCAGTTTGTGCTCTGGTGGTGGGGTCTGCATCAACCACCACCACAGATCTTCTGAAAATCCTGCCACAGTCTGGTCCAATCCGGTGGTATC
AAGTCTATGGGCATCACCACCTGAGTACAGTACGCTGTTGGTATCATGACCGTTACCATGACCTTTAAACTGGGTCTGCGTAAAGCTACCCGTCGTTGG
AACCACAACCCAGGTGTGATCCACCACACGCTGCAGGTATCTGCCATACGTTCTGTACGCCGACCCGCTACCGAGCAAAGCAGCATCACCCTCAC
GGCTTCGAGAAACCCGGAAGAACTGTGGACTGCAAAATCCCGTGTTCATCCGCTGGAACACCATCACCACCATCACTAAGAATTC

>R4A300

CATATGACTTCTGTTAATTTCTGCGGAAGCATCTACTGGTGTGGTGGTGGTGGCTCTAACCCAGTGAAGTCCATGTGGTCTGAAGGTGCTACCTTCAGCGCAAACTCCGTGAC
CTGCACCTTCAGCCGTCAGTTTCTGATTCGCTACGACCCAGAGCATCACTATAAAGTGTCTCTCCAGCTGCTTCCAGCTGTCATAACGCAATCTGGCAAAGAAAGCAAAAGTTT
GTACTATTTCTCCGATTATGGGCTATTTACCCCGTGGCGTTATCTGGATTTCACAGCCCTGAACTGTCTTTTTCTCCACTGGAGTTCAGCATCTGATCGAAAACATATGGC
TCTATTGCTCCAGACGCACTGACCGTAACCATCTCCGAAAATCGCGGTAAAGACGTTTACCACAAAACCTGGTGGTGGTGTACAGGTTACCGATTCTACTACCGGTCGCTGTG
CATGCTGGTTGACCCAGGTAACAAGTATCCATACGTAAGTGGTCAAGGTCAGGACACTCTGGCTCCAGAGCTGCCGATTTGGGTGATTTTCCGCCACAGTACGGGTATCTGA
CTGAGTACGTAACACTACCGGTATCTCCGTTGATTCGAAAGAACTGGCTTCTGAAAGAGAGCGCTTCTATGTAAGTGAACATCTCAGCTTCCAGCTGAGGATCGGTTGGT
GGTACTGCTACCATGAGTACAATAATCCACCAGTTCACCACAGAACTGGAAGGTTGTTCCAGCACTTTTACGAGATGTACAATCCGCTGTACGGTTCCTGCTGGGTGT
TCCAGATACCCCTGGTGGTGAACCAAGTTCCGTTCTCTGACTCAGGAGGATCATGCTATCCAGCCGAGAAATTTTATGCCAGGTCCTGTTAACAGCGTTTCTACCAAAG
AAGGTGACAGCAGCACTGACGTTTCTTCTCTGTTATACCTCTCTGGGTGCTATGTTGCTCTGTTATGGCAAACCAAGTGTACTGCTTCCAAACAAGATCGATCGAATCATC
AAAACCTTCAGCAACGGCTGTGATTACGTGTCTAACAAGGTATGGACACTGTTTCTGTGGCAATACCCTGAGCACTGGTGCAGGTAAGGCTCTGACTGGTCTGTCTACCGG
TACTCTCAGAACACCCGATATCTCTCTGCGTCCAGGTCAGTATCTCAGCCGTCACCACCACTGGGACACCCGAAATAACGTTACCGGTTATTAATGCAATCTCCACCGGTGAGA
CCACCTACGTTAATGCTGAAGACAAGAAATATCAGCAGGGTGTAGGTCGTTTTCCGAAACGAAAGAACAGCTGAAGCGTCTGACGGGTGAAACATGCATCACTTATTTCCCG
AACAAGGTACCCAGCAATACACTGATCAGATCGAACGCTCCGCTGATGGTGGTAGCGTTTGAATCGTGTGCGCTGCACTACGAGTCCAGCTGTGGTCTAAAATCCCAA
CCTGGATGACTCTTTCAAGACTCAGTTTGTCTGCTGGTGGTGGGGTCTGCATCAACCACCACCACAGATCTTCTGAAAATCCTGCCACAGTCTGGTCCAATCCGGTGGTA
TCAAGTCTATGGGCATCACCACTCTGGTACAGTACGCTGTTGGTATCATGACCTGTTACCATGACCTTTAAACTGGGTCTGCGTAAAGCTACCGGCTGGTGGAAACCCAAACA
GGTGTGTACCACCACAGCTGCAGGTCATCTGCCATACGTTCTGTACGCCGACCCGCTACCGAGCAAAGCAGCATCACCCTCACGGCTTCGAGAAACCCGGAAGAACTGTG
GACTGCAAAATCCCGTGTTCATCCGCTGGAAACCATCACCACCATCACTAAGAATTC

12.3 SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE LAS PROTEÍNAS SILVESTRES F DEL VSR Y VP2 DEL PARVOVIRUS B19 Y DE LAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS CON ASAS MODIFICADAS

Secuencia de la proteína VP2 con histidinas no modificada

>VP2

MTSVNSAEASTGAGGGGNSPVKSMWSEGATFSANSVTCTFSRQFLIPYDPEHHYKVFSPAASSCHNASGKEAKVCTISPIMGYSTPW
RYLDFNALNLFFSPLEFQHLIENYGSIAPDALTVTISEIAVKDVTDKTGGGVQVTDSTTGRCLMLVDHEYKYPYVLGGQDTLAPEL
PIWVYFPPQYAYLTVGDVNTQGISGDSKKLASEESAFYVLEHSSFQLLGTGGTATMSYKFPVPPENLEGCSQHFYEMYNPLYGSRL
GVPDTLGGDPKFRSLTHEDHAIQPNFMPGPLVNSVSTKEGDSSTGAGKALTGLSTGTSQNTRISLRPGPVSQPYHHWTDKYVVTG
INAI SHGQTTYGNAEDKEYQQGVGRFPNEKEQLKQLQGLNMHTYFPNKGTTQYTDQIERPLMVGSVWNRALHYESQLWSKIPNLDD
SFKTQFAALGGWGLHQPPPQIFLKI LPQSGPIGGIKSMGITTLVQYAVGIMVTMTFKLGRKATGRWNPQPGVYPPHAAGHLPYVL
YDPTATDAKQHHRHGFEKPEELWTAKS RVHPLEHHHHHH

Secuencia de aminoácidos de la proteína F (GenelD: 1489825) del virus Sincial respiratorio (ACCESO: NC_001781) (NCBI, 2010). En resaltado la secuencia de 57 aminoácidos de la región 4 de la proteína F del VSR: RESIDUOS 400 A 456

> Proteína F del VSR.

MELLIHRLSAIFLTLAINALYLTSSQNITEEFYQSTCSAVSRGYFSALRTGWYTSVITIELSNIKETKCNGTDTKVKLIKQELDK
YKNAVTELQLLQNTPAANNRAREAPQYMNITINTTKNLNVSISKRRRFLGFLGVSASIASGIAVSKVLHLEGEVNIKIKNA
LLSTNKAVVSLNSGVSVLTSKVLDLKNNINQLLPVNVQSCRI SNIETVIEFQQKNSRLLEINREFSVNAGVTTPPLSTYMLTNS
ELLSLINDMPTINDQKLMSSNVQIVRQSYSIMSIIKEEVLAYVYVQLPIYGVIDTPCWKLHTSPLCTTNIKEGSNICLTRTDRG
WYCDNAGSVSFFPQADTCKVQSNRVFCDTMSLTLTLPSEVSLCNTDIFNSKYDCKIMTSK **TDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTAS**
NKNRGLIKTFNSGCDYVSNKGMDTVSVGNTLYVNKLKLGKLNLYVKGPEPI INYDPLVFPSEDFDASISQVNEKINQSLAFIRRS
ELLHNVTGKSTTNIMITTTIIIVIVVLLSLIAIGLLLYCKAKNTPVTLTKDQLSGINNIASF"

Secuencia de aminoácidos de la región 4 de la proteína F del VSR ensamblado por PCR (Donado por la M. en C. Areli Moran)

>f-R4VSR

TDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGLIKTFNSGCDYVSNKGMDTVSVGNTL

Proteína quimérica con la región 4 de la proteína F del VSR flanqueada por el asa de residuos 265 a 271

>R4A265

MTSVNSAEASTGAGGGGNSPVKSMWSEGATFSANSVTCTFSRQFLIPYDPEHHYKVFSPAASSCHNASGKEAKVCTISPIMGYSTPW
RYLDFNALNLFFSPLEFQHLIENYGSIAPDALTVTISEIAVKDVTDKTGGGVQVTDSTTGRCLMLVDHEYKYPYVLGGQDTLAPEL
PIWVYFPPQYAYLTVGDVNTQGISGDSKKLASEESAFYVLEHSSFQLLGTGGTATMSYKFPVPPENLEGCSQHFYEMYNPLYGSRL
GVPDTL **TDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGLIKTFNSGCDYVSNKGMDTVSVGNTL**GGDPKFRSLTHEDHAIQPNFMPG
PLVNSVSTKEGDSSTGAGKALTGLSTGTSQNTRISLRPGPVSQPYHHWTDKYVVTGINAI SHGQTTYGNAEDKEYQQGVGRFPNEK
EQLKRLQGLNMHTYFPNKGTTQYTDQIERPLMVGSVWNRALHYESQLWSKIPNLDDSFKTQFAALGGWGLHQPPPQIFLKI LPQSG
PIGGIKSMGITTLVQYAVGIMVTMTFKLGLRKATGRWNPQPGVYPPHAAGHLPYVLYDPTATDAKQHHRHGFEKPEELWTAKS RVH
PLEHHHHHH

Proteína quimérica con la región 4 de la proteína F del VSR flanqueada por el asa de residuos 300 a 314

>R4A300

MTSVNSAEASTGAGGGGNSPVKSMWSEGATFSANSVTCTFSRQFLIPYDPEHHYKVFSPAASSCHNASGKEAKVCTISPIMGYSTPW
RYLDFNALNLFFSPLEFQHLIENYGSIAPDALTVTISEIAVKDVTDKTGGGVQVTDSTTGRCLMLVDHEYKYPYVLGGQDTLAPEL
PIWVYFPPQYAYLTVGDVNTQGISGDSKKLASEESAFYVLEHSSFQLLGTGGTATMSYKFPVPPENLEGCSQHFYEMYNPLYGSRL
GVPDTLGGDPKFRSLTHEDHAIQPNFMPGPLVNSVSTKEGDS **TDVSSSVITSLGAIVSCYGKTKCTASNKNRGLIKTFNSGCDYV**
SNKGMDTVSVGNTLSTGAGKALTGLSTGTSQNTRISLRPGPVSQPYHHWTDKYVVTGINAI SHGQTTYGNAEDKEYQQGVGRFPNEK
EQLKRLQGLNMHTYFPNKGTTQYTDQIERPLMVGSVWNRALHYESQLWSKIPNLDDSFKTQFAALGGWGLHQPPPQIFLKI LPQSG
PIGGIKSMGITTLVQYAVGIMVTMTFKLGLRKATGRWNPQPGVYPPHAAGHLPYVLYDPTATDAKQHHRHGFEKPEELWTAKS RVH
PLEHHHHHH

12.4 MAPA DEL PLÁSMIDO pET-22b(+) Y DE LOS PLÁSMIDOS QUIMÉRICOS

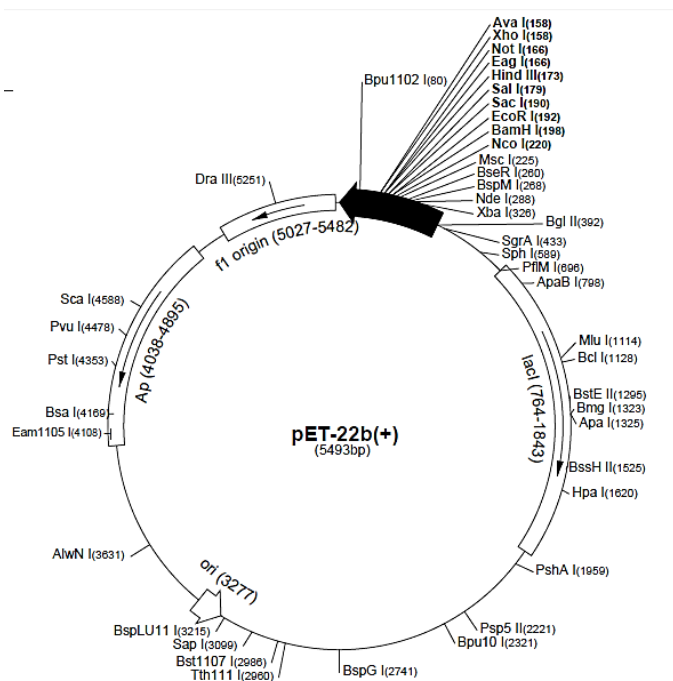


Fig. A6. Plásmido de expresión pET-22b(+) (Novagen). En este plásmido la región flanqueada en el extremo 5' por el sitio *NdeI* y en el extremo 3' por el sitio *EcoRI* fue removida por digestión enzimática, y en su lugar se colocó la secuencia del gen quimérico R4A265 o R4A300.

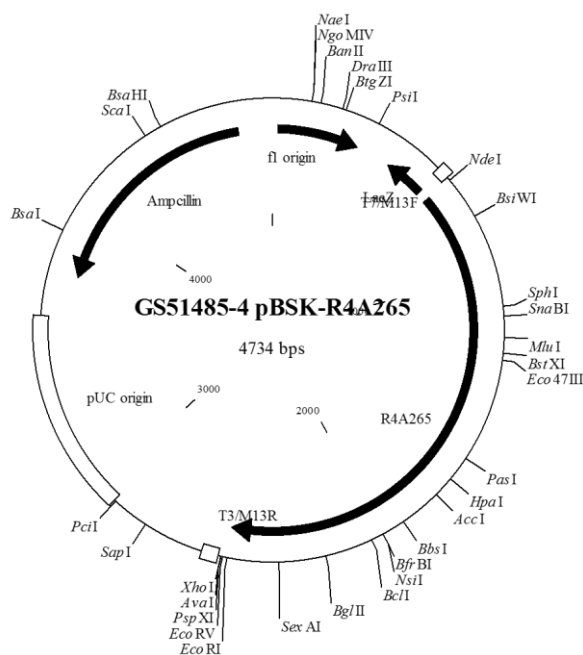


Fig. A7. Plásmido GS51485-4 pBSK-R4A265. En este plásmido la región flanqueada en el extremo 5' por el sitio *NdeI* y en el extremo 3' por el sitio *EcoRI* presenta el gen R4A265 que codifica para una proteína VP2 que en el asa (residuo 265) exhibe la región 4 de la proteína F del VSR.

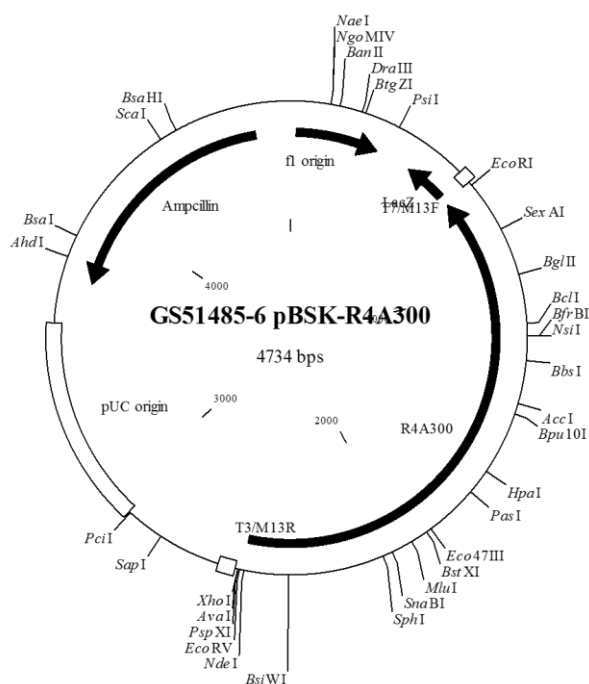


Fig. A8. Plásmido GS51485-4 pBSK-R4A300. En este plásmido la región flanqueada en el extremo 5' por el sitio *NdeI* y en el extremo 3' por el sitio *EcoRI* presenta el gen R4A300 que codifica para una proteína VP2 que en el asa (residuo 300) exhibe la región 4 de la proteína F del VSR.

12.5 PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA VP2 Y QUIMERICAS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD

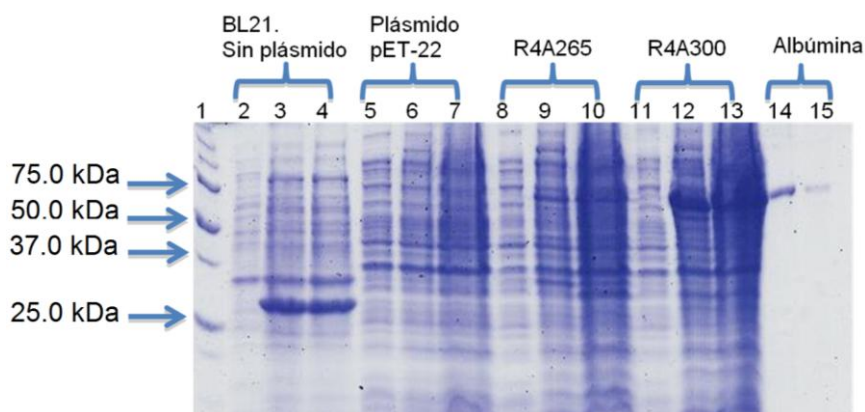


Fig. A9. Análisis de las proteínas expresadas por la colonia R4A300-2 (asa 300 modificada con la región 4) y proteínas de la colonia R4A265-2 (asa 265 modificada con la región 4). De cada cultivo (100 mL) en el que fue inducida la expresión de proteína recombinante por 12 h a 37 °C (agitación 250 rpm), se tomaron muestras para cada colonia (1 mL). Se recuperó una muestra de cultivo antes de la inducción, y después de haber adicionado el inductor (IPTG, 0.5 mM) a las 3 h y a las 12 h. (izquierda a derecha de cada grupo). Carril 1. Marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ All Blue Standards, M.W.10–250 kDa-Bio-Rad); Carriles 14 y 15. Albúmina, 1 µg y 0.1 µg respectivamente. Para cada grupo de izquierda a derecha se cargó lo equivalente a 10% del cultivo total, sin inductor y con inductor.

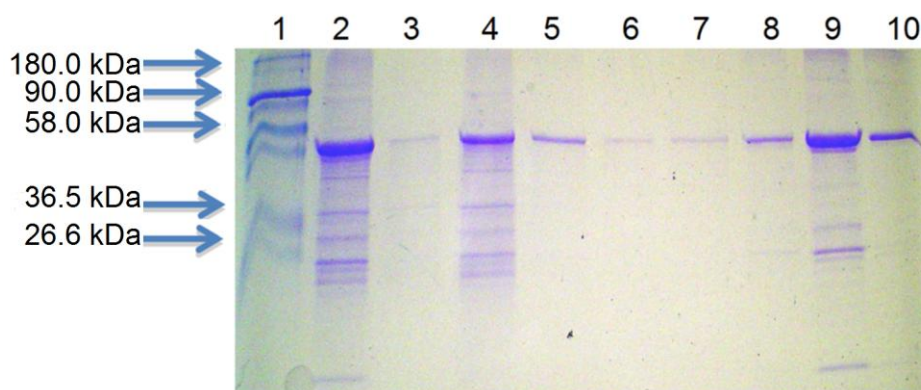


Fig. A10. Purificación de la proteína VP2. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12.5% y tinción con azul de Coomassie de las proteínas recuperadas durante la cromatografía de afinidad. Carril 1. Marcador de peso molecular (Prestained molecular Weight Marker- M.W.26 kDa-180 kDa, Sigma); Carril 2. Cuerpos de inclusión solubilizados a partir de los cuales se purificó la proteína VP2; Carril 3. Lavado de la columna con solución C; Carril 4. Lavado de la columna con solución D; Carril 5. Primera fracción de la elución de la columna con solución E; Carril 6. Segunda fracción de la elución de la columna con solución E; Carril 7. Tercera fracción de la elución de la columna con solución E; Carril 8. Cuarta de la elución de la columna con solución E; Carril 9. Lavado de la columna con solución F; Carril 10. Concentrado de las fracciones eluidas con la solución E. Proteína recuperada en una sola corrida de purificación a partir de 20 mL de cuerpos de inclusión.