



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIO DEL EFECTO DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LA
PRODUCCIÓN Y ENSAMBLAJE DE ENSAMBLADOS PROTEICOS
MULTIMÉRICOS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M.C. Ricardo Martín Castro Acosta

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Laura A. Palomares Aguilera
IBT-UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Brenda Valderrama Blanco
IBT-UNAM

Dr. Luis Padilla Noriega
Fac. Medicina-UNAM

MÉXICO, D. F. Octubre, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de la beca de doctorado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 40376). Además se contó con apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico a través del proyecto DGAPA IT-200113, CONACYT C.B. 101847 y SALUD (CONACYT-2007-C01-69911). Un agradecimiento a las M. en C. Vanessa Hernández, Ruth Pastor y Rosa Román, por el apoyo logístico durante la realización de este trabajo.

Esta tesis está dedicada a:

A mis padres, Ricardo Castro y Felicitas Acosta, quienes siempre me han apoyado en cada una de las decisiones que he tomado. A mis hermanos que con base en su apoyo y amistad hacen que todo sea más sencillo.

Agradecimientos

A la Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera por aceptarme en su laboratorio hace ya más de 8 años –considerando la maestría-, por su apoyo incondicional tanto personal como académico. Yo sé que no ha sido fácil tenerme tanta paciencia y por ello, siempre le estaré completamente agradecido.

Al Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich por sus sabios consejos, sugerencias, sermones, experiencias. Ha sido un placer y un honor estar en su grupo.

A los miembros de mi comité tutorial por sus aportaciones y sugerencias durante este proyecto

Dra. Brenda Valderrama Blanco

Dr. Luis Padilla Noriega

A los miembros del jurado, por sus comentarios y sugerencias

Dra. Gloria Saab Rincon

Dra. Rosario Vera Estrella

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro

Dra. Claudia L. Treviño Santa Cruz

Dr. Tomás López Díaz

Por el apoyo técnico recibido durante la ejecución de este proyecto de maestría por las siguientes personas e instituciones:

Unidad de microscopía electrónica del Instituto de Biotecnología y del Instituto Nacional de Salud Pública.

Dra. Rosana Sánchez, Dra. Guadalupe Zavala por su apoyo en la unidad de microscopía, IBT-UNAM. Alba Lecona por su apoyo en la unidad de microscopía, INSP.

Especial agradecimiento a Gloria Villa, Antonio Bolanos e Ing. Jalil Saab de la unidad de Docencia IBT-UNAM, por su apoyo durante mis estudios de doctorado.

Gracias a Karin Levy, M. en C. Vanessa Hernández, M. en C. Ruth Pastor, Rosa Román, M. en C. Martha Contreras, por su apoyo logístico durante mi estancia en el laboratorio.

Gracias a mis queridos compañeros y amigos, Mabel, Adriana, Mauricio Trujillo, Lili, Germán, Antonino, Alvaro, Luis, William, Mauricio, Ricardo, Julio Cesar, Jimmy, todos ellos de la vieja banda, y a los nuevos integrantes del grupo, Carolina, Fran, Paz, David, Hernán, Jaqueline, Wendy, Tonatiuh, Elizabeth, Oriana, Ramón y Esteban -espero no se me olvide nadie más. Además, a los integrantes del grupo Galindo. A mis queridos amigos, Yovis, Anita, Katherine B, Mauricio H, Elena, Giovani, a los chicos del ajedrez, a los del fucho de los viernes, los del voli, los del tenis de mesa, los del INSP.

TABLA DE CONTENIDOS

Índice de figuras	9
Índice de tablas	12
Nomenclatura	9
Resumen	15
Abstract	17
1. Introducción	19
2. Antecedentes	
2.1. Las especies reactivas de oxígeno y el estrés oxidante	22
2.2. Oxidación de macromoléculas	25
2.3. Oxidación de proteínas terapéuticas	27
2.4. Ensamblados proteicos multiméricos	28
2.5. Oxidación de virus y ensamblados proteicos virales	30
2.6. Rotavirus	31
2.6.1. VP6 de Rotavirus	33
2.7. Producción de ensamblados proteicos multiméricos en el sistema células de insecto baculovirus	36
2.7.1. Sistema de células de insecto baculovirus (SCI-BV)	36
2.7.2. Producción de EROs en el sistema CI-B	37
3. Justificación, hipótesis y objetivos	39
3.1. Hipótesis	39
3.2. Justificación	39
3.3. Objetivo general	39
3.3.1. Objetivos específicos	40
4. Materiales y métodos	41
4.1. Líneas celulares y técnicas de cultivo	41
4.2. Baculovirus recombinantes	41

4.3. Determinación del título viral	42
4.3.1. Cálculo del título viral	42
4.4. Producción de VP6 de rotavirus	44
4.5. Purificación de nanotubos de VP6	44
4.6. Cuantificación de proteína total	45
4.7. Caracterización de nanotubos de VP6 y proteína VP6 desensamblada	
4.7.1. SDS-PAGE y Western blot	46
4.7.2. Desensamblaje de nanotubos de VP6	46
4.7.3. Permeación en gel por HPLC (PG-HPLC)	47
4.7.4. Medición de tamaño de partícula por dispersión dinámica de luz	48
4.7.5. Microscopía electrónica de transmisión	48
4.7.6. Espectrofluorimetría	48
4.8. Oxidación <i>in vitro</i>	49
4.8.1. Centro de masa espectral de fluorescencia	49
4.9. Cuantificación de la carbonilación en proteínas	50
4.10. Determinación de bitirosinas por espectrofluorimetría	52
4.11. Re-ensamblaje de proteína oxidada	52
4.12. Determinación de especies reactivas de oxígeno intracelulares	53
4.13. Cuantificación de aminoácidos	53
5. Resultados y discusión	55
5.1. Evaluación del estrés oxidante y EROs en células de insecto por espectrofluorimetría	55
5.2. Producción y purificación de VP6	64
5.3. Caracterización de nanotubos de VP6	66
5.4. SDS-PAGE y carbonilación de proteína	69
5.5. Análisis por dispersión dinámica de luz de VP6 _{NT} y VP6 _U oxidadas	75
5.6. Análisis de permeación en gel por HPLC y espectroscopía de fluorescencia de las muestras oxidadas de VP6 _{NT}	77

5.7. Re-ensamblaje de proteína VP6 _U oxidada	81
5.8. Efecto del proceso de purificación en la carbonilación de la proteína VP6	83
5.8.1. Evaluación del re-ensamblaje y carbonilación de la proteína VP6 removida por permeación en gel	89
6. Conclusiones	92
7. Perspectivas	94
8. Contribuciones	95
9. Referencias	97
Anexos	111
A.1. Diferencia en la eficiencia cuántica del producto desensamblado y nanotubos de VP6	111
A.2. Geles desnaturizantes SDS-PAGE de proteína oxidada	112
A.3. Espectros de fluorescencia de proteína VP6 _U oxidada con H ₂ O ₂	113
A.4. Carbonilación de BSA a diferentes tiempos de incubación con oxidantes	114
A.5. Formación de bitirosinas en proteínas oxidadas	115
A.6. Effect of metal catalyzed oxidation in recombinant viral protein assemblies	116
A.7. Strategies for the purification and characterization of protein scaffolds for the production of hybrid nanobiomaterials	129
A.8. Understanding internalization of rotavirus VP6 nanotubes by cells: towards a recombinant vaccine	137

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Especies reactivas de oxígeno	23
Figura 2. Reacción de H ₂ DCF-DA con las EROs	24
Figura 3. Mecanismos de oxidación de proteínas por EROs	26
Figura 4. Producción de carbonilos en proteína debido a diferentes mecanismos oxidantes.	27
Figura 5. Esquema estructural de rotavirus	32
Figura 6. Estructura cristalográfica de VP6 de rotavirus con una resolución de 2Å	34
Figura 7. Micrografías electrónicas de transmisión de nanotubos de VP6 e icosaedros de VP6	34
Figura 8. Micrografías electrónicas de transmisión de nanotubos de VP6 funcionalizados con Au y Ag	35
Figura 9. La adición de H ₂ O ₂ en cultivos de células High Five afecta el crecimiento celular y su viabilidad	56
Figura 10. La adición de H ₂ O ₂ en cultivo de células High Five no afecta la morfología	56
Figura 11. Microscopía de fluorescencia de células sf9 cargadas a diferentes concentraciones de H ₂ DCF-DA y tratadas con 50 mM H ₂ O ₂	57
Figura 12. La adición de H ₂ DCF-DA a células en cultivo no cambia su cinética de crecimiento	58
Figura 13. Intensidad de fluorescencia de H ₂ DCF-DA durante las cinéticas de crecimiento de cultivos de células sf9 cargados	59
Figura 14. Cinéticas de crecimiento de células sf9 infectadas con bacVP6 a una MDI de 1ufp/cel	60
Figura 15. Cinética de intensidad de fluorescencia de H ₂ DCF-DA en células sf9 infectadas con bacVP6 a una MDI de 1ufp/cel	61
Figura 16. Análisis de producción de VP6 en sobrenadante por Western blot	61
Figura 17. Análisis de intensidad de fluorescencia de células High Five cargadas con H ₂ DCF-DA sometidas a condiciones sub-letales de estrés oxidante	62

Figura 18. Cinética de crecimiento de células High Five® en medio Express Five infectadas con bacVP6	65
Figura 19. Etapas cromatográficas en la purificación de VP6 de rotavirus	66
Figura 20. Caracterización de los nanotubos de VP6	68
Figura 21. Análisis por PG-HPLC y MET de VP6 ensamblada en nanotubos y desensamblada	69
Figura 22. Intensidad de las bandas en los geles SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes de BSA, VP6 _U y VP6 _{NT} a diferentes tiempos de oxidación	71
Figura 23. Contenido de carbonilos en BSA; VP6 _U y VP6 _{NT} a diferentes concentraciones de H ₂ O ₂	74
Figura 24. Análisis por dispersión dinámica de luz de VP6 _{NT} y VP6 _U oxidadas por MCO a diferentes concentraciones de H ₂ O ₂	76
Figura 25. Micrografías electrónicas de transmisión de las muestras oxidadas por MCO de VP6 _{NT} y VP6 _U	77
Figura 26. Análisis por PG-HPLC de muestras de VP6 _{NT} oxidadas por MCO a diferentes concentraciones de H ₂ O ₂	78
Figura 27. Análisis de las muestras oxidadas por VP6 _{NT} y VP6 _U por espectroscopia de fluorescencia	80
Figura 28. Re-ensamblaje de VP6 _U oxidada con diferentes concentraciones de H ₂ O ₂	82
Figura 29. Observación por microscopía electrónica de transmisión de las muestras de VP6 _U oxidadas a diferentes concentraciones de H ₂ O ₂ y sometidas a las condiciones de ensamblaje de VP6 _{NT}	83
Figura 30. SDS-PAGE de las etapas de purificación de la proteína VP6 de rotavirus en medio Express Five® y Excell 405®	85
Figura 31. Micrografías electrónicas de transmisión de VP6 purificada en medio A) Express Five® y B) Excell 405®	87
Figura 32. Carbonilación de proteína total en las diferentes etapas de purificación la proteína VP6 en los medios de cultivo Express Five® y Excell 405®	89
Figura 33. SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes de la proteína presente en los picos recolectados de SEC	90

Figura 34. Micrografía electrónica de transmisión de la muestra del pico 2 de SEC sometida a re-ensamblaje	91
Figura A1. Espectro de fluorescencia de Trp de nanotubos y proteína desensamblada	111
Figura A2. Geles desnaturizantes de proteína oxidada por MCO	112
Figura A3. Espectro de fluorescencia de Trp y Trp/Tyr de VP6 _U oxidada con H ₂ O ₂	113
Figura A4. Carbonilación de BSA en diferentes condiciones oxidantes y tiempos de incubación	114
Figura A5. Formación de bitirosinas en proteínas oxidadas	115

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Algunas partículas pseudo virales producidas	30
Tabla 2. Proteínas estructurales mayoritarias de la cápside de rotavirus SA11	32
Tabla 3. Coeficientes del ajuste de la ecuación 7 sobre los datos de carbonilación a diferentes concentraciones de H ₂ O ₂	74
Tabla 4. Análisis de la purificación de VP6 en medio Express Five [®] y Excell 405 [®]	86
Tabla A1. Coeficientes de ajuste de la ecuación 7 sobre los datos de carbonilación a diferentes concentraciones de H ₂ O ₂ en BSA	114

NOMENCLATURA

a	Constante de saturación
bacVP6	Baculovirus que codifica para la proteína VP6 de rotavirus
BSA	Albúmina bovina
[C]	Concentración de carbonilos
[C _{max}]	Concentración máxima de carbonilos
CME	Centro de masa espectral
DLS	Dispersión dinámica de luz
DNPH	2-4 dinitrofenilhidrazina
EPM	Ensamblados proteicos multiméricos
EROs	Especies reactivas de oxígeno
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HBsAg	Antígeno de superficie de Hepatitis B
IEX	Intercambio iónico
K _D	Coefficiente de partición
μ	Velocidad específica de crecimiento
MCO	Oxidación catalizada por metal
MET	Microscopía electrónica de transmisión
MPA	Multimeric protein assemblies
NO•	Óxido nítrico
NT	Nanotubos
ONOO ⁻	Peroxinitrito
O ₂ • ⁻	Superóxido
O ₃	Ozono
•OH	Radical hidroxilo
•OOH	Peroxi-hidroxilo

PPR	Partículas pseudo-virales de Rotavirus
PG	Permeación en gel
PV	Proteínas virales
RPKT	Residuos Arginina, Prolina, Lisina y Treonina
SCI-BV	Sistema de células de insecto baculovirus
SEC	Exclusión molecular
TOD	Tensión de oxígeno disuelto
URF	Unidades relativas de fluorescencia
V_i	Longitud de onda (nm)
V_e	Volumen de elución de la proteína en la columna
V_o	Volumen vacío de columna
VP6	Proteína VP6 de Rotavirus
VP6 _U	VP6 desensamblada (trímeros y monómeros)
VP6 _{NT}	VP6 nanotubos
V_t	Volumen total de columna

RESUMEN

La oxidación de proteínas es uno de los fenómenos más estudiados, ya que provoca pérdida de actividad, inmunogenicidad, ruptura de cadenas laterales, proteólisis, entre otras modificaciones. Estos efectos son causados por la modificación covalente de aminoácidos, que genera cambios conformacionales. A pesar de su importancia, poco se ha estudiado sobre la oxidación que sucede durante la producción de proteínas recombinantes, y menos aún en ensamblados proteicos multiméricos (EPM). Los EPM se producen de forma recombinante al expresar proteínas virales que se autoensamblan en estructuras complejas altamente ordenadas, cuyas aplicaciones como inmunógenos, nanoacarreadores y nanotemplados, se han demostrado. En este trabajo decidimos evaluar cómo la oxidación afecta la producción de nanotubos de VP6 de rotavirus, los EPM de estudio. Para ello, se realizaron experimentos de oxidación *in vitro* de la proteína ensamblada en forma de nanotubos (VP6_{NT}) y desensamblada (VP6_U). Se encontró que la oxidación provocó la carbonilación de VP6_U como en VP6_{NT}, una modificación covalente de las proteínas que es un excelente indicador de su daño por oxidación. Se observó que el ensamblaje en nanotubos confiere protección a varios residuos al evitar que estén expuestos al solvente, sin embargo, aquellos residuos expuestos al solvente en el nanotubo tuvieron una afinidad mayor a las especies reactivas de oxígeno que aquellos en VP6_U. Se encontró que la oxidación provocó agregación de VP6_U y una disminución del tamaño de VP6_{NT}. Por otra parte, se observaron cambios en el ambiente hidrofóbico de los aminoácidos aromáticos presentes tanto en VP6_U y VP6_{NT}, identificados por cambios en el centro de masa espectral de fluorescencia. Por último, se determinó que la oxidación redujo la eficiencia de ensamblaje de la proteína VP6_U en nanotubos, y aquellos nanotubos que se ensamblaron a partir de VP6_U oxidada tuvieron baja calidad, determinada por observación en microscopía electrónica.

Adicionalmente, se evaluaron las diferentes etapas del proceso de purificación de los nanotubos de VP6, e identificamos que como parte del proceso, la etapa de producción dentro de la célula resulta en un mayor daño oxidante que la purificación, durante la cual no se observó un incremento en la carbonilación. Como parte del análisis, también

identificamos que la proteína no ensamblada durante la etapa de producción contiene una mayor cantidad de carbonilos que la ensamblada, y no tiene la capacidad de ensamblarse en nanotubos. En este trabajo se estudió por primera vez el efecto de la oxidación en ensamblajes proteicos y se correlacionó directamente con la calidad de los ensamblados obtenidos.

ABSTRACT

Protein oxidation is one of the most studied phenomena, as it provokes loss of activity, immunogenicity, rupture of lateral chains, proteolysis, among other modifications. These effects are caused by the covalent modification of amino acids, which generates structural changes. Despite its importance, very little has been studied about the occurrence of oxidation during the production of recombinant proteins, much less in multimeric protein assemblies (MPA). Multimeric protein assemblies are obtained when recombinant viral proteins that self-assemble in highly-ordered complex structures are expressed, and their application as immunogens, nanocarriers and nanotemplates has been demonstrated. In this work we evaluated the effect of oxidation on nanotubes of VP6 of rotavirus, the MPA of study. *In vitro* oxidation experiments were done with the protein assembled as a nanotubes (VP6_{NT}) or unassembled (VP6_U). The results show that oxidation caused the carbonylation of VP6_U and VP6_{NT}, a covalent modification of proteins that is an excellent indicator of the extent of damage provoked by oxidation. It was observed that assembly of VP6 into nanotubes protected various residues from oxidation, as it reduced their exposure to the solvent. However, the residues exposed to the solvent in VP6_{NT} had a higher affinity to the reactive oxygen species than those in VP6_U. It was found that oxidation caused aggregation of VP6_U and a decrease of the size of VP6_{NT}. Moreover, changes in the hydrophobic environment of the aromatic amino acids present either in VP6_U and VP6_{NT} were observed, as detected by changes in the center of fluorescence spectral mass. Lastly, it was determined that oxidation reduced the assembly efficiency of VP6_U into nanotubes, and the nanotubes that assembled from oxidized VP6_U had low quality, as determined by electron microscopy.

Additionally, oxidation was quantified at the different steps of the purification process of VP6_{NT}. No increase in oxidation during purification was observed, indicating that most of the oxidation occurred intracellularly or during the recovery process. It was also observed that unassembled VP6 isolated during the purification stage was more extensively

carbonylated than assembled VP6, and it did not have the capacity to assemble into nanotubes. We studied for the first time the effect of the oxidation in protein assemblies and it was directly correlated with the quality of the obtained assemblies.

Capítulo 1

Introducción

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) son moléculas de oxígeno que contienen electrones desapareados en su capa de valencia, lo que las vuelve altamente reactivas (Hirst et al., 2008). Dentro de las EROs podemos encontrar tanto los radicales libres: $O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$, $\bullet OOH$, NO^{\bullet} , entre otros, así como compuestos no radicales, como H_2O_2 , $ONOO^-$, O_3 , entre otros (Berlett et al., 1995; Hirst et al., 2008; Ottaviano et al., 2008). Las EROs, por su naturaleza altamente reactiva, son capaces de reaccionar con una gran variedad de moléculas (proteínas, lípidos y azúcares), provocando su oxidación (Berlett et al., 1995; Goetz y Luch, 2008, Hawe et al., 2012). Las EROs se producen en la mitocondria debido a la respiración celular, NADPH oxidasas y 5-lipoxigenasas, dismutación espontánea en citoplasma y en plantas en cloroplasto y pared celular (Hirst et al., 2008; Ottaviano et al., 2008). Además, se ha observado que las EROs pueden producirse y oxidar moléculas durante los procesos de purificación, formulación y almacenamiento de proteínas terapéuticas (Li et al., 1995; Hawe et al., 2012; Torosantucci et al., 2013).

La oxidación de proteínas es uno de los fenómenos más estudiados a lo largo de los últimos años buscando entender los mecanismos de dichas reacciones de oxidación, así como formas de evitarla (Bourdon y Blache, 2001; Barelli et al., 2008). La oxidación en proteínas provoca cambios en aminoácidos que pueden afectar la estructura secundaria y terciaria de la proteína, disminuyendo su función. En estudios en pacientes con enfermedades crónicas y degenerativas como Alzheimer, cáncer, aterosclerosis, entre otras, se ha observado un incremento en la cantidad de proteínas oxidadas (Barelli et al., 2008; Goetz y Luch, 2008). Por otra parte, existe un gran número de estudios *in vitro* que describen el efecto de la oxidación de proteínas como BSA, IgG, lisozima y antitripsina humana $\alpha 1$, al oxidarse con diferentes EROs como H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$. Estos estudios describen que la oxidación provoca agregación, daño estructural, cambios en propiedades fisicoquímicas, hidrofobicidad y

conformación de las proteínas (Baron et al., 2006; Liu et al., 2008; Hu et al., 2008; Guedes et al., 2009; Mulinacci et al., 2011). Con respecto a estructuras más complejas, como los virus y los ensamblados proteicos multiméricos (EPM), existen pocos reportes en la literatura. En el caso de los virus, la oxidación provoca daños en la cápside viral, induciendo agregación y cambios conformacionales, lo que disminuye su capacidad infecciosa (Meunier et al., 2004; Rule et al., 2010; Sano et al., 2010; Bounty et al., 2012; Ogata et al., 2012). Por otra parte, la oxidación de los EPM ha sido muy poco estudiada. Existe solo un reporte en la literatura que aborda la oxidación de EPM (antígeno de superficie de hepatitis B, HBsAg) y cuya oxidación provocó la agregación y pérdida de su capacidad inmunogénica (Tleuglabulova et al., 1999).

Entre las proteínas recombinantes para uso terapéutico, los EPM han cobrado gran importancia, ya que están formadas por proteínas estructurales virales que se autoensamblan en estructuras altamente ordenadas idénticas a la cápside del virus nativo (Noad y Roy, 2003). Además, poseen características estructurales, fisicoquímicas e inmunogénicas similares a las de los virus nativos, por lo que se han convertido en alternativas como vacunas, entre otras aplicaciones (Boisgerault et al., 2002; Noad y Roy, 2003; Blutt et al., 2005, Palomares y Ramírez, 2009; Rodríguez-Limas et al., 2013). La producción de EPM no es una tarea simple, ya que no solamente se requiere la producción de la proteína viral (o las proteínas virales) en cuestión, además, se requieren ciertas condiciones para que se lleve a cabo el ensamblaje de la proteína viral en estructuras altamente ordenadas (Palomares y Ramírez, 2009). Una proteína muy interesante debido a sus características polimórficas, es la proteína VP6 de rotavirus ya que puede ensamblarse en tubos de diámetros de 45 y 75 nm y pueden alcanzar micrómetros de largo, así como en icosaedros de diámetro de ~75 nm (Lepault et al., 2001; Mathieu et al., 2001). El polimorfismo de VP6 puede regularse controlando las condiciones de pH y fuerza iónica, con lo que es posible obtener trímeros, nanotubos, o icosaedros (Mathieu et al., 2001). Los nanotubos formados por la proteína VP6 han demostrado tener propiedades inmunogénicas únicas. Se ha demostrado su alta inmunogenicidad al ser comparados con la proteína en forma trimérica y otros EPM de rotavirus (partícula de doble capa) (Pastor-Flores et al., 2014), así como en estudios de coadministración con partículas pseudo-virales de

norovirus, en donde se observó un efecto adyuvante de los nanotubos de VP6 (Blazevic et al., 2011). Además, se han utilizado en estudios de funcionalización con diferentes metales tanto en la capa externa del tubo (Plascencia-Villa et al., 2009), como en la parte interna del nanotubo (Carreño-Fuentes et al., 2013) con la finalidad de conferirles diferentes propiedades magnéticas, catalíticas, etc.

En este proyecto se planteó analizar el efecto de la oxidación sobre los nanotubos de VP6 así como de la proteína desensamblada, con la finalidad de determinar si la oxidación provoca daños en los EPM de VP6 de rotavirus y con ello, lograr entender el fenómeno para diseñar estrategias racionales de producción que nos permitan evitar la oxidación y así mejorar el proceso de producción de nanotubos de VP6.

Capítulo 2

Antecedentes

2.1. LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y EL ESTRÉS OXIDANTE

El oxígeno constituye el 21% de la composición del aire, siendo un elemento esencial que ha permitido el desarrollo y evolución de la vida en el planeta (Fisher, 2014). Dentro del metabolismo de las células aerobias el oxígeno juega un papel fundamental, ya que es el último aceptor de electrones en la cadena respiratoria (Lenaz et al., 1999; Turrens, 2003; Hirst et al., 2008; Schulz et al., 2014). Sin embargo, el metabolismo del oxígeno produce moléculas altamente inestables y reactivas, las cuales se denominan especies reactivas de oxígeno (EROs), dentro de las que se encuentran una gran variedad de compuestos como $O_2\cdot^-$, $\cdot OH$, $\cdot OOH$, $NO\cdot$, H_2O_2 , $ONOO^-$, O_3 , entre otros (Betlett et al., 1996; Hirst et al., 2008; Ottaviano et al., 2008; Bounocore et al., 2010). El término EROs se aplica a una gran variedad de moléculas que son radicales libres, así como a compuestos de oxígeno que son fácilmente convertidos en radicales libres y aquellos que convierten otras especies químicas en radicales libres (Hirst et al., 2008; Ottaviano et al., 2008) (Figura 1).

Las EROs se generan a partir del oxígeno y su producción celular es producto de reacciones catalizadas por enzimas celulares como son citocromo P_{450} , NADPH oxidasa, xantina deshidrogenasa, lipoxigenasas, etc, pero principalmente se producen como subproducto de la cadena respiratoria. Se ha reportado que entre el 1 y 2% del oxígeno utilizado en la cadena respiratoria se convierte en EROs (Lenaz et al., 1999; Turrens, 2003; Hirst et al., 2008). La producción de EROs también es causada por mecanismos exógenos, tales como la reacción de oxígeno con metales, luz UV, radiación, etc. (Davies y Dean, 1997; Bounocore et al., 2010; Fu et al., 2014; Rastogi et al., 2014). Los metales como Fe y Cu, son muy importantes para la generación de EROs, ya que catalizan la reacción de Fenton ($Fe^{+2} + H_2O_2 = \cdot OH + ^-OH + Fe^{+3}$), en la que a partir de H_2O_2 se produce el radical

hidroxilo (Meucci et al., 1991; Baron et al., 2006). Las EROs tienen diferentes tiempos de vida media que van desde meses para el caso de los peróxidos (en condiciones de buen almacenaje) y micro-pico-nano segundos para las moléculas como $\bullet\text{OH}$ y $\text{O}_2\bullet^-$ lo cual dependerá del ambiente en el cual se generen los oxidantes (Davies y Dean, 1997; Burns et al., 2012). El $\bullet\text{OH}$ generalmente tiene tiempos de vida media de nano-pico segundos (Davies y Dean, 1997).

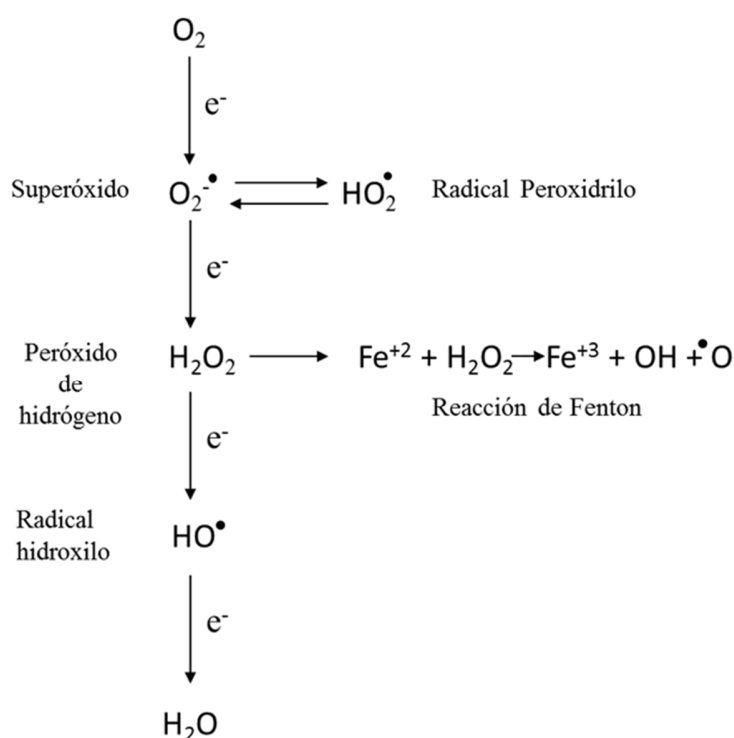


Figura 1. Especies reactivas de oxígeno. Las EROs son generadas por reacciones secuenciales de reducción del oxígeno molecular produciendo diferentes intermediarios de diferente reactividad. Modificada de Desikan et al., 2005.

A nivel celular, existen diferentes mecanismos enzimáticos y no enzimáticos para contener con la producción de EROs, (utilizando glutatión principalmente). Dentro de las enzimas responsables de contener contra las EROs se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), peroxidasas (PRX), catalasas (CAT), glutatión reductasa (GR), glutatión peroxidasa (GPR), entre otras. Cada una de estas enzimas cataliza reacciones que resultan en diversos productos a partir de las EROs, como agua (Lenaz et al., 1999; Turrens, 2003; Hirst et al., 2008; Ottaviano et al., 2008; Bounocore et al., 2010). Un exceso de EROs puede ocasionar

la alteración del potencial redox celular, y afectar el nivel energético de la célula (ATP, NAD/NADH y NADP/NADPH), causar daño en el material genético, peroxidación de lípidos de membrana, degradación de proteínas, muerte celular, etc. (Lenaz et al., 1999; Turrens, 2003; Goetz y Luch, 2008; Hirst et al., 2008; Lassoued et al., 2008; Ottaviano et al., 2008). La mayoría de los procesos celulares que llevan a cabo transferencia de electrones, como la señalización, diferenciación celular, formación de puentes bisulfuro, plegamiento de proteínas, etc., pueden verse afectadas por el incremento en la producción de EROs, y resultar en daño celular (Schafer y Buettner, 2001).

La producción de EROs en la célula se puede observar y cuantificar utilizando diferentes herramientas, entre las que se encuentran métodos enzimáticos, fluorimétricos, espectroscópicos, entre otros (Dikalov y Harrison, 2014). Los más ampliamente utilizados, debido a su sensibilidad y amplio espectro de detección de EROs, son los fluorimétricos, ya que permiten medir *in situ* e *in vivo* la producción de EROs. Los fluoróforos más utilizados son DHE, mitoSOX, DCFH-DA, DHR, Amplex red, entre otros. En particular, el DCFH-DA es muy recurrido debido al amplio rango de EROs que es capaz de detectar, además de que puede permear dentro de la célula hasta la mitocondria y reaccionar con las EROs producidas (Figura 2) (Kalyanaraman et al., 2012; Aranda et al., 2013).

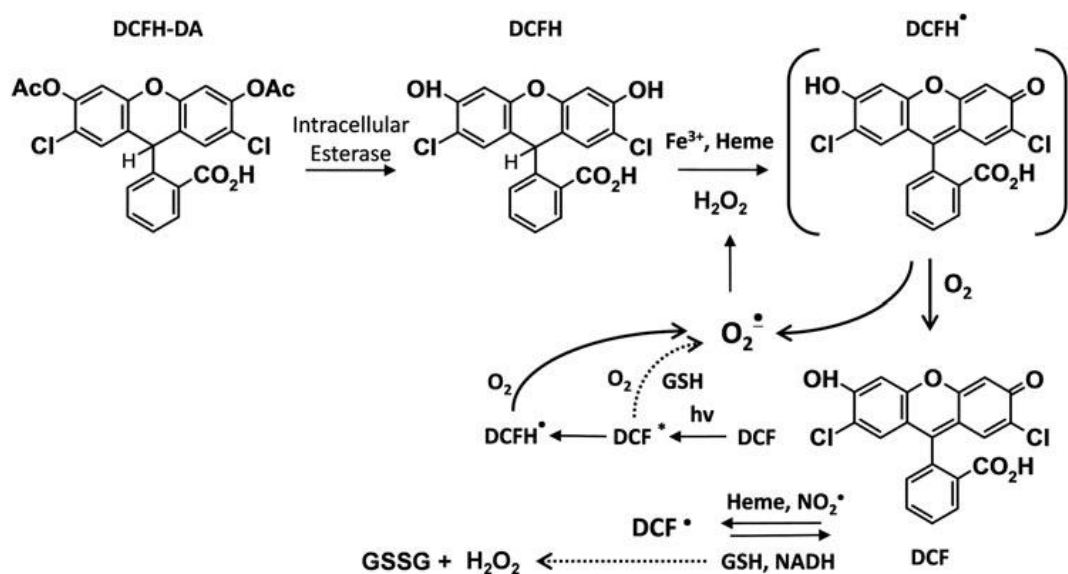


Figura 2. Reacción de DCFH-DA con las EROs. La molécula de DCFH-DA es permeable a la membrana celular y ya dentro de la célula sus esterés son hidrolizados por esterasas endógenas que no permiten su salida

de la célula. El producto oxidado de DCFH que ya reaccionó con las EROs intracelulares es fluorescente lo que permite detectarlas. Tomada de Dikalov y Harrison, 2014.

2.2. OXIDACIÓN DE MACROMOLÉCULAS

Las especies reactivas de oxígeno, al ser tan reactivas, son capaces de reaccionar con lípidos, azúcares y proteínas, siendo las proteínas en las que nos centraremos en este trabajo. La oxidación de proteínas debida a EROs es uno de los fenómenos más estudiados a lo largo de los últimos años, buscando entender los mecanismos de las reacciones de oxidación, así como formas de minimizarla (Bourdon y Blache, 2001; Barelli et al., 2008, Torosantucci et al., 2013). La oxidación en proteínas provoca cambios en aminoácidos que pueden afectar la estructura secundaria y terciaria de la proteína, disminuyendo su función. Todos los aminoácidos son susceptibles a ser oxidados lo que depende de la especie reactiva en cuestión. Diferentes reportes en la literatura indican que existen aminoácidos más susceptibles que otros a ser oxidados los cuales son la cisteína, metionina, tirosina, triptófano, fenilalanina e histidina (Davies y Dean, 1997; Stadtman y Levine, 2003). Algunos de los daños estructurales que sufren las proteínas son la ruptura del enlace peptídico, oxidación sitio específica catalizada por metales, carbonilación, cross-linking proteína-proteína, entre otros (Stadtman y Levine, 2003; Barelli et al., 2008; Maissonneuve et al., 2009), siendo todos y cada uno de estos daños oxidantes importantes a la hora de evaluar la calidad de una proteína.

La ruptura del enlace peptídico podría definirse como el daño más grave en la proteína, debido a que la proteína se fragmenta incluso hasta fragmentos del tamaño de aminoácidos (Davies y Dean, 1997; Headlam y Davies et al., 2004). Se han propuesto mecanismos para explicar la ruptura del enlace peptídico, como son la α -amidación y el mecanismo diamida (Figura 3A). No solamente se rompe el enlace peptídico, sino también las cadenas laterales de los aminoácidos. Headlam y Davies (2004) observaron que la alanina, valina, leucina, isoleucina y aspartato pueden sufrir escisión- β , generando compuestos como formaldehído, acetona, isobutiraldehído y ácido glioxílico como productos de la ruptura de la cadena lateral de estos aminoácidos (Figura 3B).

Una de las modificaciones más importantes desde el punto de vista analítico es la carbonilación, ya que es un producto altamente estable, fácil de analizar y cuantificar por métodos espectrofotométricos (Dalle-Donne et al., 2003; Fedorova et al., 2013). La carbonilación de proteínas es una modificación covalente que se produce principalmente en los aminoácidos arginina, prolina, lisina y treonina, por su oxidación directa por EROs, mientras que otros aminoácidos como triptófano, histidina y cisteína, pueden formar carbonilos debido a reacciones secundarias con otras especies carboniladas (Dalle-Donne et al., 2003; Maisonneuve et al., 2009; Fedorova et al., 2013) (Figura 4).

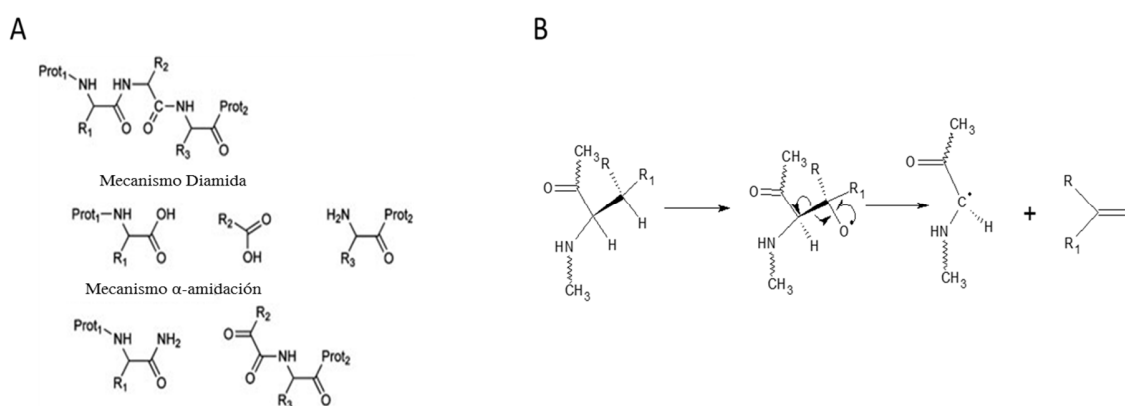


Figura 3. Mecanismos de oxidación de proteínas por EROs. A) Ruptura del enlace peptídico. B) Modificación de las cadenas laterales de las proteínas por escisión-β. Tomado de Headlam y Davies, 2004.

La carbonilación puede ser provocada por diferentes mecanismos e involucran diferentes aminoácidos (Fedorova et al., 2013). Varios grupos han intentado entender como sucede la formación de carbonilos en proteínas y uno de los acercamientos más interesantes es el propuesto por el grupo de Maisonneuve y colaboradores (2009), quienes proponen que analizando la secuencia de aminoácidos en la proteína es posible localizar sitios que tengan una alta probabilidad de oxidación. Estos sitios se identifican al considerar la cantidad de residuos RPKT presentes en la secuencia de aminoácidos de la proteína (tienen que encontrarse presentes 3 por cada 4 aminoácidos), la exposición de estos residuos al solvente y que existan sitios de unión a metal o residuos hidrofóbicos cercanos a los residuos RPKT.

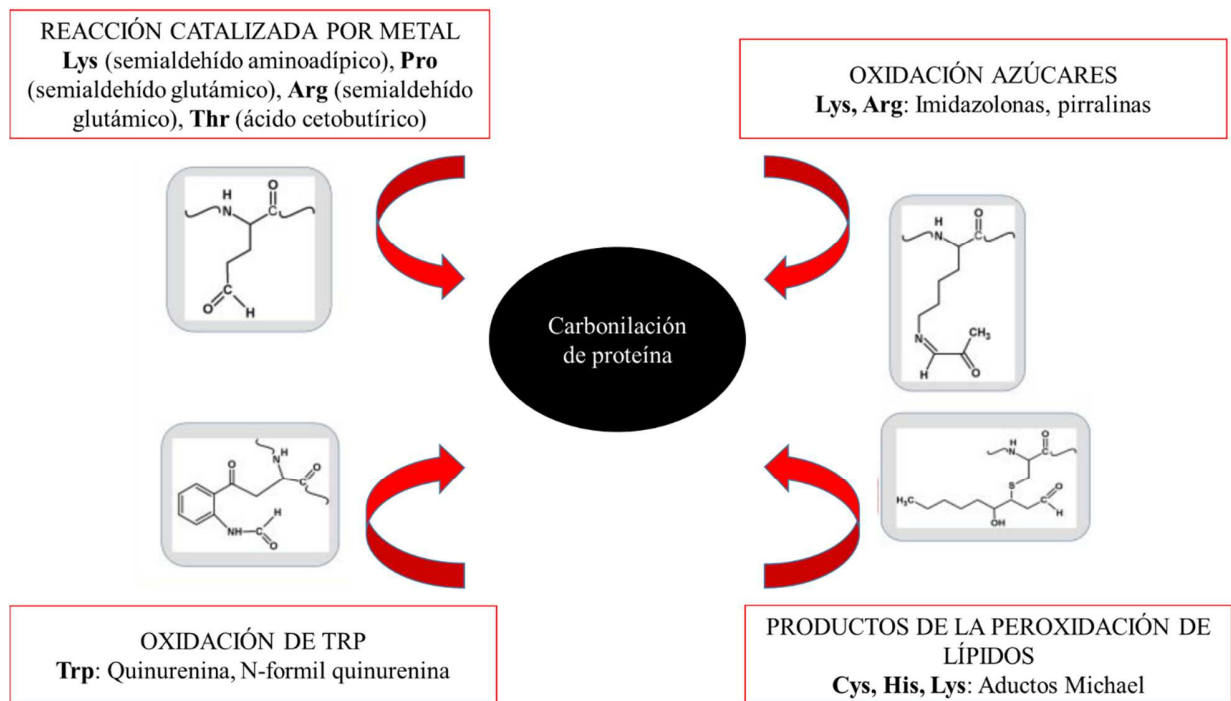


Figura 4. Producción de carbonilos en proteínas debido a diferentes mecanismos oxidantes. La carbonilación de proteína se produce principalmente (más no exclusivamente) en los aminoácidos lisina, prolina, arginina, treonina, triptófano, cisteína e histidina. Modificado de Fedorova et al., 2013.

2.3. OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS TERAPEUTICAS

La oxidación como anteriormente se describió, es un fenómeno ampliamente estudiado, sin embargo, cuando se habla de proteínas recombinantes de interés farmacéutico, la oxidación cobra una importancia mayor, sin embargo, ha sido poco estudiada. Se ha demostrado que la oxidación no solamente puede llevarse a cabo en la producción de proteína recombinante en la célula, sino que también ocurre durante los procesos de purificación y almacenaje de la misma (Li et al., 1995; Torosantucci et al., 2013). Mohammadian-Mosaabadi y colaboradores (2005), demostraron que la oxidación afecta la producción de Interferon- γ (IFN- γ). Observaron, que al incrementarse la tensión de oxígeno disuelto (TOD) en cultivos de *E coli* recombinante (produciendo IFN- γ) se incrementaba la proporción de proteína agregada mientras su capacidad catalítica disminuía. Por otra parte, durante la purificación de dehidrofolato reductasa por cromatografía de afinidad a metal, se observaron productos de oxidación cuya pérdida de actividad fue importante y comparable a la oxidación *in vitro*

con H₂O₂ (Krishnamurthy et al., 1995). La formulación y almacenaje de proteínas es también un paso crucial dentro del proceso de producción. Diferentes estudios han confirmado que el fenómeno de oxidación también se produce durante la formulación, debido a la presencia de moléculas pro-oxidantes en las soluciones, además del tiempo y tipo de almacenaje. Se ha observado que la presencia de contaminantes como H₂O₂, hidroperóxidos, metales traza, entre otros, en soluciones que contienen sorbitol, polietilenglicol (PEG) y ascorbato provocan la oxidación de la proteína durante su almacenaje (Miller et al., 1990; Buettner y Jurkiewicz, 1996; Kerwin, 2008; Wu et al., 2011; Maggio, 2012)

2.4. ENSAMBLADOS PROTEÍCOS MULTIMÉRICOS

Los ensamblados proteicos multiméricos (EPM) son proteínas virales que se auto-ensamblan en estructuras idénticas a los virus nativos o en macroestructuras altamente ordenadas con tamaño del orden de nanómetros (Palomares et al., 2006, Chackerian y Schiller, 2012; Noad y Roy, 2013; Rodríguez-Limas et al., 2013). La producción de EPM no es una tarea simple, ya que requiere la expresión simultánea de una o varias proteínas virales que deben encontrarse en un ambiente y concentración adecuadas para su ensamblaje (Palomares et al., 2006, Rodríguez-Limas et al., 2013). Los EPM se producen al expresar las proteínas estructurales del virus de interés en un sistema recombinante. Dichas proteínas se ensamblan en estructuras idénticas a los virus nativos pero sin el material genético, por lo que no son infecciosas. Los EPM desencadenan una fuerte respuesta inmune humoral y celular, ya que se ha observado que estimulan respuestas mediadas por células B, activación de linfocitos CD8⁺ y de células presentadoras de antígeno (Ruedl et al., 2002; Lenz et al., 2003; Noad y Roy, 2003, Ye et al., 2006; Blazevic et al., 2011; Rodríguez-Limas et al., 2014; Pastor et al., 2014). Debido a estas características, y a que los EPM no presentan material genético viral, representan una ventaja importante en el diseño de vacunas más seguras (Boisgerault et al., 2002; Blutt et al., 2005; Rodríguez-Limas et al., 2013). Ya existen en el mercado vacunas de EPM, como la vacuna contra la hepatitis B (Recombivax HB, Merck), la vacuna contra el papiloma (Cervarix de GlaxoSmithKline,

Gardasil de Merck), y la vacuna contra la influenza humana (Flublok®, Protein Sciences Corporation), así como otras en pruebas clínicas. En la Tabla 1 se muestran algunos de los EPM que han sido expresadas en sistemas recombinantes.

El ensamblaje de los EPM no requiere de proteínas no estructurales del virus del cual proceden o ácidos nucleicos virales para mantener la estabilidad de las cápsides, ya que para la formación de los EPM solo es necesario que existan las interacciones proteína-proteína necesarias que permitan llevar a cabo su ensamblaje. (Crawford et al., 1994, Trask y Dormitzer, 2006, Palomares y Ramírez et al., 2009). Dada la capacidad de ensamblaje de algunas de las proteínas virales (PV), bajo ciertas condiciones cada una de las proteínas expresadas puede formar estructuras multiméricas. Las proteínas virales se ensamblan en condiciones que propician la interacción entre las proteínas y mantienen estas interacciones estables (Ding et al., 2010; Zlotnick, 2003). Las interacciones que mantienen unidas a las proteínas virales formando EPM son las fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y puentes bisulfuro. Todas estas interacciones son dependientes de la fuerza iónica, pH, potencial redox y la concentración de ciertos metales o iones (Phelps et al., 2000; Ceres y Zlotnick, 2002; Zlotnick, 2003). Hasta el momento no se conocen cuáles son las condiciones en las que se lleva a cabo el ensamblaje *in vivo* de los EPM al ser producidas en diferentes sistemas de expresión. Sin embargo, en experimentos *in vitro* se han definido algunas condiciones necesarias para que se lleve a cabo el ensamblaje, entre ellas el pH, fuerza iónica, temperatura, concentración de proteínas virales, así como el efecto de algunos agentes químicos, lo que ha permitido entender parte del mecanismo de ensamblaje de los EPM, aunque aún no se han llevado a cabo experimentos *in vivo* (Zlotnick, 2003; Ausar et al., 2006; Mena, 2007; Mukherjee et al., 2008; Mena et al., en preparación). En nuestro laboratorio hemos estudiado extenuantemente la producción de EPM utilizando como modelo las partículas pseudovirales de rotavirus (PPR) y en los últimos años, hemos centrado nuestros esfuerzos principalmente en la producción de nanotubos de VP6 de rotavirus.

Tabla 1. Algunas partículas pseudo virales producidas

MPV	# proteínas en la cápside
Hepatitis B	1
Hepatitis C	1
HIV	1
Norwalk	1
Rotavirus	4
Papilomavirus	1
Parvovirus canino	1
Parvovirus B19	1
Poliovirus	4
Fiebre aftosa	1
CCMV	1

(Adaptado de Roy y Noad, 2008; Rodríguez-Limas et al., 2013)

2.5. OXIDACIÓN DE VIRUS Y ENSAMBLADOS PROTEICOS MULTIMÉRICOS

La oxidación de macromoléculas como EPM ha sido muy poco estudiada. Solamente se encontró un artículo en la literatura en el que se evalúa la oxidación de una EPM como modelo (el antígeno de superficie de hepatitis B, HBsAg). La oxidación del HBsAg con radicales de peroxibisulfato provocó agregación y pérdida de su capacidad inmunogénica (Tleuglabulova et al., 1999). Con este estudio, los autores intentaron explicar el fenómeno de agregación que observaron durante el proceso de producción de HBsAg en *Pichia pastoris*. Utilizaron hasta 500 mM de H₂O₂ para llevar a cabo la reacción de Fenton, •OH, sin obtener los productos de agregación esperados. Solamente con los radicales de peroxidisulfato se observó la agregación y pérdida de la capacidad inmunogénica evaluada por ensayos de ELISA con anticuerpos policlonales y monoclonales.

Por otra parte, existen otros estudios en la literatura que estudian el efecto de la oxidación en virus. En estos estudios, se evalúa el efecto de las EROs o agentes exógenos, como es el caso de radicación UV, y demuestran que la oxidación provoca daños en la cápside viral,

induciendo agregación y cambios conformacionales, lo que disminuye la capacidad infecciosa del virus (Meunier et al., 2004; Rule et al., 2010; Sano et al., 2010; Bounty et al., 2012; Ogata et al., 2012).

2.6. ROTAVIRUS

Las proteínas estructurales de los rotavirus han sido tema de estudio de nuestro grupo de investigación por varios años. Los rotavirus pertenecen a la familia *Reoviridae* y son la causa más importante de muerte por diarrea en niños menores de 5 años. En el 2008 se reportaron 453,000 muertes por diarrea (Glass et al., 2014). El genoma de rotavirus está conformado por 11 segmentos de ARN de doble cadena, con un total de 18.5 kb que codifican 6 proteínas estructurales y 6 proteínas no estructurales. Las cápsides rotavirales tienen un diámetro aproximado de 75 nm, con una geometría icosaédrica y simetría T= 13 (número de triangulación). El ARN y 2 proteínas estructurales (VP1 y VP3) están confinados en el interior de la cápside de tres capas concéntricas formadas por las proteínas VP2, VP6, VP7 y VP4 (Estes y Cohen, 1989) (Tabla 2). La formación de la nucleocápside (50 nm de diámetro) se da por la interacción de 120 unidades de VP2 (60 dímeros de VP2) (Estes y Cohen, 1989; Zeng et al., 1998). Las proteínas VP1 y VP3 se encuentran dentro de la nucleocápside, y su función principal no es estructural sino la de ARN polimerasa y guanilil transferasa, respectivamente. Se ha comprobado que la ausencia de las proteínas VP1 y VP3 no afecta la estabilidad de la nucleocápside (Lawton et al., 1996). La proteína VP6 conforma la segunda capa de proteína de la cápside y es además, la proteína más abundante en la misma. Se encuentra formando 260 trímeros (780 moléculas), dando lugar a una estructura de 70 nm de diámetro (Gilbert et al., 2001; Mathieu et al., 2001).

La tercera capa está conformada por la proteína glicosilada VP7 (260 trímeros), que es dependiente de calcio para su ensamblaje y estabilidad (Estes y Cohen, 1989; Ruiz et al., 1996). La proteína VP4, se ensambla en trímeros que conforman espículas que sobresalen aproximadamente 12 nm de la cápside viral (Prasad et al., 1990; Yeager et al., 1994; Dormitzer et al., 2004). Se ha demostrado que la capa externa de la cápside, conformada

por las proteínas VP7 y VP4, permite la interacción con la célula huésped al estar vinculada con el reconocimiento y penetración del virus (Ruiz et al., 1994; Isa et al., 2008) (Figura 5).

Tabla 2. Proteínas estructurales mayoritarias de la cápside de rotavirus SA11 (Estes y Cohen, 1989)

Proteína	PM (kDa)	# Moléculas/cápside	Abundancia relativa (p/p)
VP2	102	120 (60 dímeros)	13
VP6	46	780 (260 trímeros)	39
VP7	37	780 (260 trímeros)	31
VP4	86	180 (60 trímeros)	17

Los rotavirus se clasifican en grupos y subgrupos, de acuerdo a la inmunoreactividad de VP6 (grupos A-E). El grupo A es el de mayor importancia, ya que es el principal responsable de las infecciones por rotavirus en humanos. Dentro de este grupo, los rotavirus se han agrupado en diferentes genotipos de acuerdo a la secuencia nucleotídica de los genes de las proteínas VP4 (genotipo P) y VP7 (genotipo G). Hasta la fecha, se han caracterizado 35 genotipos P y 27 genotipos G (Matthijssens et al., 2011).

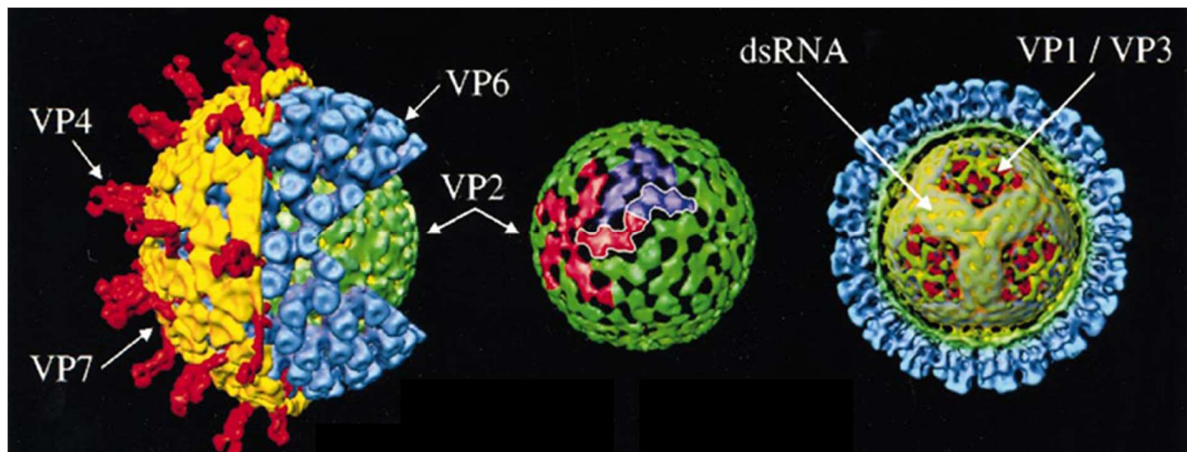


Figura 5. Esquema estructural de rotavirus. La cápside de rotavirus está compuesta de 4 proteínas estructurales principales y dos (VP1 y VP3) que se encuentran al interior de la núcleo cápside que protege el material genético (VP2). (Tomado de Patton y Spencer 2000).

2.6.1. VP6 DE ROTAVIRUS

La proteína VP6 está compuesta por 397 aminoácidos e interacciona con la proteína VP2 hacia el interior de la cápside y con las proteínas VP7 y VP4 de la capa externa del virus (Estes y Cohen, 1989; Yeager et al., 1994). La estructura cristalográfica de la proteína VP6 muestra la presencia de dos dominios estructurales denominados B y H (Figura 6A). El dominio B en la base de la molécula está conformado por 8 α -hélices. El dominio H, que se encuentra en la parte superior de la molécula (residuos 151-334), forma estructuras β -plegadas características de proteínas de cápside viral (Mathieu et al., 2001). Ambos dominios H y B participan en los contactos que estabilizan la estructura trimérica de la molécula teniendo diferentes interacciones participando en su estabilidad. Mientras el dominio H tiene fuertes interacciones hidrofóbicas, la interface trimérica en la base de la proteína contiene mayoritariamente residuos hidrofílicos, lo que sugieren que una baja energía de solvatación sería necesaria para disociar el dominio B. La estructura trimérica de la proteína VP6 se forma espontáneamente, siendo altamente estable a concentraciones de calcio menores de 10 mM y zinc mayores de 6 mM (Lepault et al., 2001; Mathieu et al., 2001; Erk et al., 2002). VP6 contienen 5 sitios de unión a calcio que están coordinados por diferentes residuos, el calcio 1 con N250 y Y248, el calcio 2 con D340, E134 y D337, el calcio 3 con D62 y Q47, el calcio 4 con D248 y N266 y el calcio 5 con E379, D380 y Q383. El sitio de unión a zinc está coordinado por la histidina 153 y la serina 339 siendo importante para conferirle resistencia estructural a la proteína (Erk et al., 2002) (Figura 6B).

Una de las características de VP6 más importantes es su capacidad de ensamblarse en diferentes estructuras dependiendo de la fuerza iónica y pH en el que se encuentre, como son tubos de diversos diámetros y longitudes y esferas (Figura 7). Por otra parte, se ha observado que la co-expresión recombinante de la proteína VP6 con la proteína VP2 genera el ensamblaje de estructuras icosaédricas (Sabara et al., 1991; Crawford et al., 1994; Lepault et al., 2001; Mena et al., 2006). El grupo de la Dra. Palomares y el Dr. Ramírez ha estudiado extensamente la producción de VP6 de rotavirus (Mena, 2007; Palomares et al., 2012), su purificación (Plascencia-Villa et al., 2011), su capacidad de ensamblaje (Mena et al., en preparación; Rodríguez et al., en preparación), sus características fisicoquímicas y estructurales (Ríos, 2013) y sus diversas aplicaciones como inmunógeno (Pastor et al.,

2014), en el campo de la nanotecnología (Plascencia-Villa et al., 2009; Carreño-Fuentes et al., 2013; Plascencia-Villa et al., 2013) y como sistema acarreador de moléculas con potencial terapéutico (Rodríguez et al., 2013).

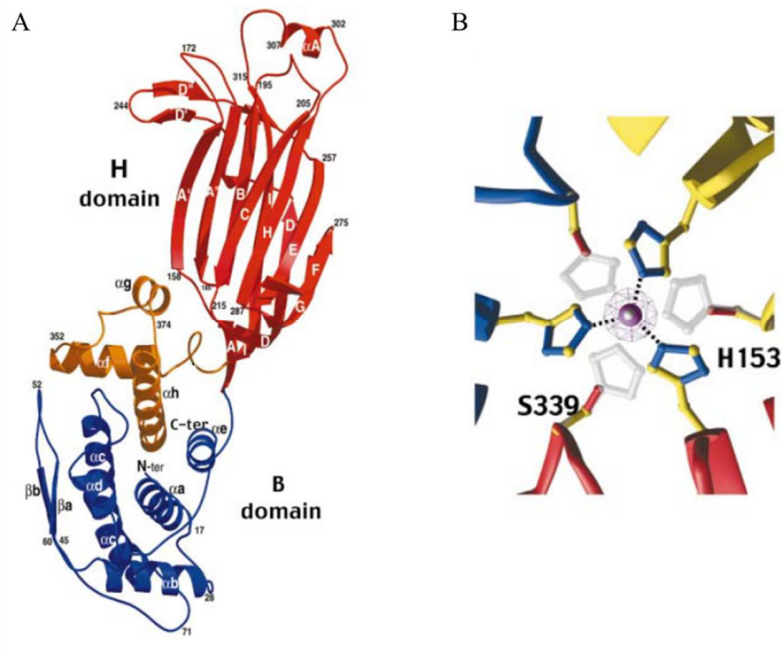


Figura 6. Estructura cristalográfica de VP6 de rotavirus con una resolución de 2Å. A) Estructura cristalográfica de VP6 de rotavirus esquematizando los dos dominios principales de la molécula. B) Sitio de unión a zinc en el trímero de VP6, coordinado por los aminoácidos His153 y Ser339 de cada uno de los monómeros. Tomado de Mathieu et al 2001.

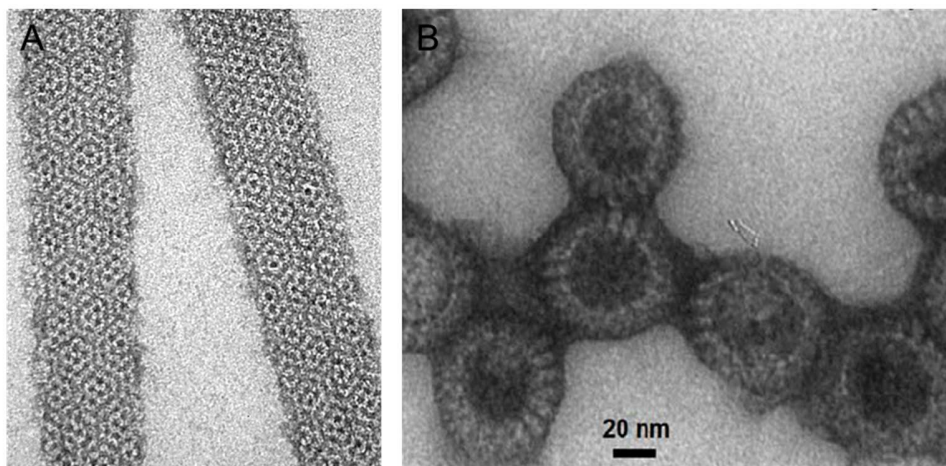


Figura 7. Micrografías electrónicas de transmisión de nanotubos de VP6 e icosaedros de VP6. A) Nanotubos. B) Icosaedros. Tomado de Plascencia-Villa et al., 2009. Micrografías electrónicas tomadas a una amplificación de 140,000.

El uso de nanotubos de VP6 como inmunógenos provocó una mayor protección en ensayos de reto en ratones al compararlos con la proteína VP6 en su forma trimérica y con estructuras de doble capa de rotavirus (Pastor et al., 2014), lo que nos indica que la estructuración en nanotubos es importante para su aplicación como vacuna. Por otra parte, Blazevic y colaboradores (2011), demostraron que los nanotubos de VP6 actúan como adyuvante en la coadministración con partículas de norovirus.

Para su utilización en nanotecnología, los nanotubos de VP6 han sido funcionalizados con diferentes metales en su exterior e interior, para conferirles diferentes propiedades magnéticas, así como catalíticas, entre otras, que les permita tener diversas aplicaciones (Plascencia-Villa et al., 2009; Carreño-Fuentes et al., 2013) (Figura 8).

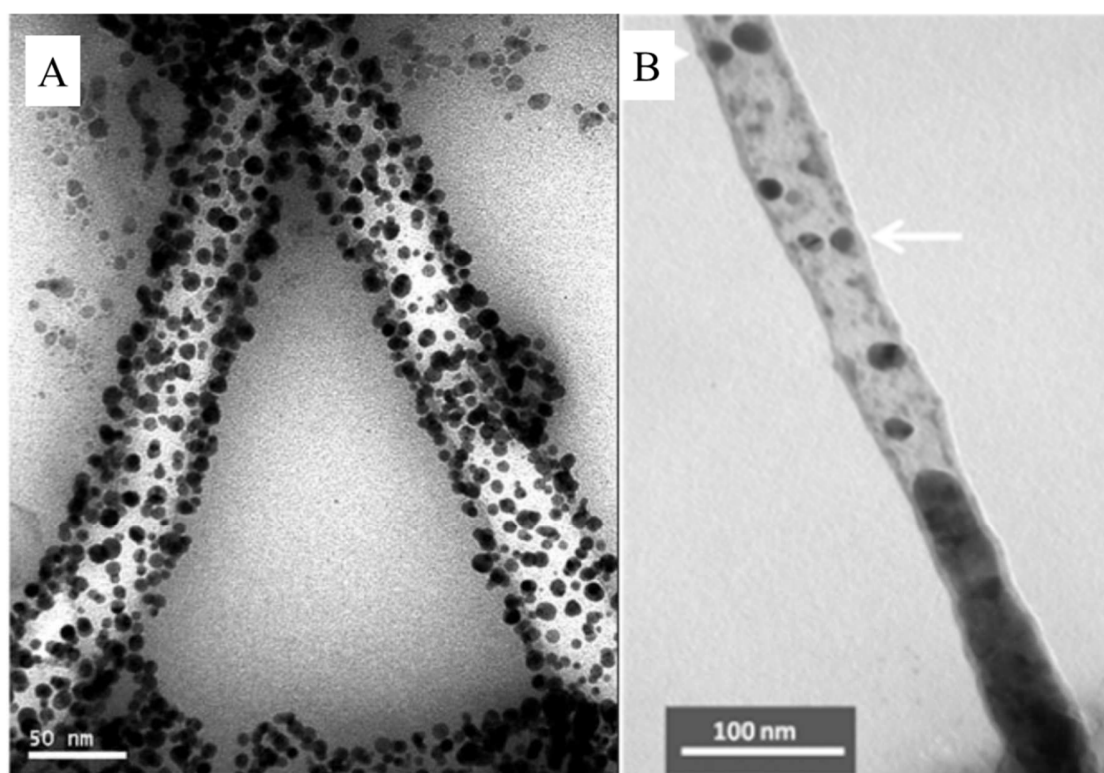


Figura 8. Micrografías electrónicas de transmisión de nanotubos de VP6 funcionalizados con Au y Ag. A) Funcionalización externa de nanotubos con Au. B) Funcionalización interna de nanotubos con Ag. Tomadas de Plascencia-Villa et al. (2009) y Carreño-Fuentes et al. (2013). La flecha en la micrografía en el panel B indica la superficie del nanotubo de VP6.

2.7. PRODUCCIÓN DE ENSAMBLADOS PROTEICOS MULTIMÉRICOS EN EL SISTEMA DE CÉLULAS DE INSECTO BACULOVIRUS

2.7.1. SISTEMA DE CÉLULAS DE INSECTO BACULOVIRUS (SCI-BV)

El sistema de células de insecto-baculovirus (SCI-BV) es una herramienta útil para la producción de proteínas recombinantes debido a su gran versatilidad ya que permite la inserción de varios genes y así, expresar varias proteínas al mismo tiempo, con una alta productividad de proteína recombinante (20-250 veces más que en células de mamífero) y la capacidad de llevar a cabo modificaciones post-traduccionales complejas (Roy et al., 1997; Berger et al., 2004; Kost et al., 2005; Palomares et al., 2006). Debido a esto, es el sistema más empleado en la producción de ensamblados proteicos multiméricos, ya sea que requieren la expresión de una sola proteína recombinante o aquellas que requieren la co-expresión de varias proteínas simultáneamente. La producción de EPM en este sistema consiste en la infección de un cultivo de células de insecto con uno o varios baculovirus recombinantes (vectores) que contengan los genes de la o las proteínas virales de interés (Pattenden et al., 2005, Rodríguez-Limas et al., 2013). En este sistema se pueden alcanzar concentraciones de proteína recombinante por arriba de 1g/L. Además, es posible trabajar con cultivos de alta densidad celular a concentraciones celulares en cultivo por lote mayores de 10×10^6 cel/mL y lote alimentado mayores de 50×10^6 cel/mL. Más de 500 proteínas se han producido en este sistema, además de un número importante de EPM (Ver Tabla 1.) (Noad y Roy, 2003; Palomares et al., 2006; Mena et al., 2010).

Debido a estas ventajas es uno de los sistemas más utilizados tanto en la producción de proteínas terapéuticas, como de proteínas virales que se ensamblan en EPM (Pattenden et al., 2005; Palomares et al., 2006, Palomares y Ramírez, 2009).

El SCI-BV consiste en la infección de un cultivo de células de insecto con un vector de baculovirus que contiene el gen de la proteína de interés. Durante las pasadas décadas, los baculovirus se han utilizado como una herramienta importante en la producción de proteínas recombinantes en células de insecto. El nucleopoliedrovirus de *Autographa californica* (AcMNPV) es el baculovirus más empleado, ya que su rango de huéspedes es más amplio que el de otros baculovirus. Para la construcción de baculovirus recombinantes

se reemplaza el gen de la poliedrina (*polh*) o el de *p10* por el gen de interés. Se han escogido estos genes porque se encuentran bajo promotores fuertes dando lugar a que la producción de ambas proteínas represente entre el 30 y 50% de la proteína celular total en células infectadas (Palomares et al., 2006).

2.7.2. PRODUCCIÓN DE EROS EN EL SISTEMA CI-B

Las células de insecto cuentan con una maquinaria enzimática para contender con la sobreproducción de EROs. Wang y colaboradores (2001a) determinaron en células de insecto la actividad de las enzimas encargadas de contender con EROs: superóxido dismutasa (SOD), catalasa, ascorbato peroxidasa (APOX), glutatión S-transferasa (GST), glutatión reductasa (GRX) y ácido deshidroascorbato peroxidasa (DHAR), así como la concentración de glutatión oxidado (Ahmad y Pardini, 1990; Wang et al., 2001a, Wang et al., 2001b). Además, demostraron que la infección con baculovirus genera estrés oxidativo (incremento en la producción de EROs y una baja en la capacidad antioxidante), pues detectaron peroxidación de lípidos (daño en la membrana plasmática) y degradación de proteínas (Wang et al., 2001b).

Las células de insecto infectadas no solamente se encuentran bajo estrés oxidante, sino que la infección también incrementa la velocidad de síntesis de ADN y proteínas y afecta la velocidad de consumo de varios compuestos, como el oxígeno, metionina, tirosina y cisteína (Palomares et al., 2004). La velocidad de consumo de glucosa y glutamina se mantienen constantes. La cisteína y la glutamina juegan un papel importante en el control del estrés oxidativo, ya que son precursores de glutatión, el cual es el principal regulador del estado redox intracelular. La metionina también es relevante al ser precursor de cisteína (Doverskog et al., 1998). La glutamina es utilizada por la célula incorporándola a al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) para la obtención de energía (Drews et al., 2000, Palomares et al., 2004).

Las células de insecto son estrictamente aerobias, y el rango de oxígeno disuelto (OD) óptimo para su crecimiento está entre 10 y 100% (con respecto a la saturación con aire), y su constante de saturación de Monod (K_{O_2}) es de 1.9% (Palomares et al., 2004). El

consumo de oxígeno de las células de insecto se incrementa hasta en un 100% durante las primeras 24 horas después de la infección. Este incremento en el consumo de oxígeno podría ser el responsable del estrés oxidativo observado por Wang y colaboradores (2001b).

En un esfuerzo por disminuir el estrés oxidativo, Vieira y colaboradores (2006) utilizaron diferentes antioxidantes (α -tocoferol, hidroxitolueno butilado, β -caroteno y catalasa) y evaluaron su efecto en la producción de las proteínas recombinantes virales de rotavirus, VP2, VP6 y VP7 en células Sf9. Solamente las catalasas aumentaron la productividad de proteína recombinante, aunque el mecanismo por el cual aumentó la productividad no fue identificado. Además, no se determinó la concentración de EPM de rotavirus ensamblado.

Por todo esto, la oxidación en EPM debe ser estudiada con el fin de determinar si aquellos productos oxidados aún mantienen las características por las cuales son importantes.

Capítulo 3

Justificación, Hipótesis y Objetivos

3.1. HIPÓTESIS

La oxidación provoca modificaciones en la estructura de VP6 que repercuten en las características de sus ensamblados y disminuyen su capacidad de ensamblaje.

3.2. JUSTIFICACIÓN

Aunque es amplio el conocimiento que se tiene sobre la oxidación de proteínas, es poco lo que se conoce sobre el fenómeno de oxidación en ensamblados proteicos multiméricos considerando características importantes como el ensamblaje y la estabilidad de las EPM. Por ello, en este trabajo se evaluó por primera vez el efecto de la oxidación *in vitro* de la proteína VP6 ensamblada en nanotubos y no ensamblada con la finalidad de incrementar el conocimiento sobre este fenómeno. El conocimiento generado sobre los factores que afectan el ensamblaje de las macroestructuras y como las EROs afectan su producción, incrementará el entendimiento de los procesos involucrados en el ensamblaje de dichas macroestructuras y será posible proponer mejores estrategias de producción.

3.3. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de las especies reactivas de oxígeno (EROs) sobre la proteína VP6 de rotavirus en su forma ensamblada y no ensamblada.

3.3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar e implementar herramientas analíticas que permitan caracterizar y cuantificar el daño oxidante en proteínas recombinantes y ensamblados proteicos.
2. Identificar las condiciones que provocan la oxidación de la proteína VP6 de rotavirus *in vitro*, en forma desensamblada y ensamblada en nanotubos.
3. Realizar cinéticas de oxidación de nanotubos de VP6 y VP6 desensamblada con el fin de determinar si hay diferencias en la susceptibilidad a la oxidación entre ambas estructuras.
4. Determinar la capacidad de la proteína VP6 monomérica oxidada de ensamblarse en macroestructuras.
5. Con base en los resultados obtenidos, proponer estrategias de producción y procesamiento que resulten en proteína ensamblada con un bajo daño oxidante. De esta forma se espera incrementar la estabilidad de los ensamblajes a lo largo del tiempo.

Capítulo 4

Materiales y métodos

4.1. LÍNEAS CELULARES Y TÉCNICAS DE CULTIVO

Se trabajó con las líneas celulares de los insectos, *Trichoplusia ni* (High Five[®]) y *Spodoptera frugiperda* (Sf9). Se utilizaron medios libre de suero SF900-II (Life Technologies, EUA), ExCell[®] 405 (Sigma-Aldrich Co. LCC, EUA), Express Five[®] (Life Technologies, EUA) y PSFM (PSC, Meriden, EUA). Las células se cultivaron en matraces agitados de 250 mL (volumen de trabajo de 60 mL). Los cultivos se mantuvieron con agitación constante a 115 RPM y a 27 °C en incubadoras Innova 4230 (New Brunswick Scientific, EUA). La amplificación de los stocks baculovirales solo se realizaron en las células Sf9, utilizando el medio SF900II (Life Technologies, EUA). La concentración y tamaño celular se determinaron utilizando un contador de partículas Coulter Multisizer 3 (Beckman Coulter, EUA) con un tubo de apertura de 100 µm. La viabilidad celular se determinó utilizando azul de tripano al 0.5% en PBS pH 7.4 y conteo en hematocitómetro.

4.2. BACULOVIRUS RECOMBINANTES

Se utilizó el baculovirus de *Autographa californica* NPV en el que se insertó el gen de la proteína VP6 de rotavirus bajo el promotor de poliedrina (*polh*). El baculovirus que codifica para la VP6 (bacVP6, SA11) fue proporcionado por la Dra. Susana López (IBT-UNAM). La amplificación de los stocks virales se realizó en matraces agitados de 250 mL a 27 °C (volumen de trabajo 60 mL) infectando células a una concentración de 0.5×10^6 cel/mL con el baculovirus recombinante (bacVP6) a una multiplicidad de infección (MDI) de 0.01 unidades formadoras de placa (ufp)/cel y cosechando el cultivo cuando la viabilidad celular se encontrara por debajo del 60%. Cuando las células alcanzaron la viabilidad celular descrita anteriormente, se cosechó el cultivo y se centrifugó a 4,000 x g a 4 °C

utilizando la centrífuga refrigerada Eppendorf 5810 R (Eppendorf, EUA). Se adicionó suero fetal bovino (0.5%) a los stocks de baculovirus para su posterior almacenaje a 4°C. El título viral se determinó como se describe en la sección 4.3. Se retitularon los baculovirus cada 4 meses. Los baculovirus se reamplificaron cuando el título viral estuvo por debajo del orden de 10^6 ufp/mL.

4.3. DETERMINACIÓN DEL TÍTULO VIRAL

El título viral se cuantificó con la metodología implementada por Mena y colaboradores (2003), la cual se basa en la determinación de la viabilidad celular después de agregar diluciones seriadas de virus. Para determinar la viabilidad se utilizó la reacción del MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio), el cual es un sustrato para la deshidrogenasa mitocondrial en las células viables. La reacción produce una sal insoluble de formazan color azul que se cuantifica espectrofotométricamente. Se colocan 5×10^3 células por pozo en 50 μ L de medio SF900II en placas de 96 pozos. Posteriormente se prepararon diluciones del virus desde 10^{-1} hasta 10^{-10} , que se agregaron a los pozos. Adicionalmente, se colocan células sin infectar para observar el máximo de crecimiento celular que se puede obtener en la placa de 96 pozos. Seis días después de la infección se añadieron 10 μ L de la solución de MTT (5 g/L) a cada pozo y se agitó la placa durante 2 horas. Después de las 2 horas, las placas se centrifugaron a 4,000 x g 10 minutos y se extrajo el sobrenadante. Las sales insolubles de formazan se disolvieron en 50 μ L de dimetilsulfoxido (DMSO) y se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas.

4.3.1. CÁLCULO DEL TÍTULO VIRAL

Mediante el análisis de la curva de absorbancia contra dilución del stock viral es posible determinar la dilución viral a la cual el 50% de las células han sido infectadas (TCLD₅₀). La curva sigue un comportamiento sigmoidal y su ajuste (Ecuación 1) nos proporcionó el valor de TCLD₅₀ mediante la siguiente ecuación (Ecuación 2):

$$Y = Y_0 + \frac{a}{1 + \left(\frac{D}{D_0}\right)^b}$$

(Ecuación 1)

Donde Y es la absorbancia medida, Y_0 es la mínima absorbancia detectada, a es la absorbancia máxima detectada, D es la dilución, D_0 es la dilución a la cual el 50% de la respuesta de absorbancia ($1/TCLD_{50}$) y b una constante. Una vez determinada la dilución a la cual el 50% de células han sido infectadas se determinó el $TCLD_{50}$ mediante la siguiente ecuación (Ecuación 2):

$$TCLD_{50}/mL = \frac{1}{D_0 V}$$

(Ecuación 2)

Donde V es el volumen de la dilución del stock viral.

El título viral se calculó mediante las ecuaciones 3 y 4 (O'Reilly et al., 1994).

$$\log TCID_{50}/mL = 0.912 (\log TCLD_{50}/mL) + 1.674 \quad \text{(Ecuación 3)}$$

$$pfu/mL = TCID_{50}/mL \times 0.69 \quad \text{(Ecuación 4)}$$

En el desarrollo de esta metodología para calcular el título viral, Mena y colaboradores (2003) realizaron la comparación con otros métodos y no se observaron diferencias significativas en los valores de títulos virales. Con fines prácticos y comparativos se utilizará la nomenclatura de ufp/mL para el título viral.

4.4. PRODUCCIÓN DE VP6 DE ROTAVIRUS

Se utilizó la línea celular High Five[®] (de *Trichoplusia ni*) cultivada en medio de cultivo SF900-II (Life Technologies, EUA), ExCell[®] 405 (Sigma-Aldrich Co. LCC, EUA), Express Five[®] (Life Technologies, EUA) o PSFM (PSC, Meriden, EUA). Las células se cultivaron en matraces agitados de 1 L (volumen de trabajo de 250 mL). Los cultivos se mantuvieron con agitación constante a 115 RPM y a 27 °C en incubadoras Innova 4230 (New Brunswick Scientific, EUA). Se utilizó un baculovirus recombinante que codifica para la proteína VP6 de rotavirus (SA11), previamente descrito. Previo a la infección, se colocó un cultivo a una concentración celular de 0.5×10^6 cel/mL y la infección se realizó a una multiplicidad de infección (MDI) de 1ufp/cel cuando dicho cultivo alcanzó una concentración celular de 1×10^6 cel/mL. Las células infectadas se cosecharon cuando la viabilidad celular estuvo por debajo del 50%, y se alcanzó la mayor concentración de proteína VP6 en el sobrenadante del cultivo. El cultivo cosechado se centrifugó a $4,000 \times g$ a 4°C con la finalidad de separar el sobrenadante (en donde se encuentran principalmente los nanotubos de VP6) para su posterior purificación. El pellet celular de cada uno de los cultivos realizados se almacenó a -20°C para su posterior purificación y análisis.

4.5. PURIFICACIÓN DE NANOTUBOS DE VP6

El protocolo de purificación que se utilizó en este trabajo está descrito con mayor detalle en Plascencia-Villa et al., 2011 (anexos). El sobrenadante cosechado del cultivo infectado se concentró en un equipo de ultrafiltración AMICON (Millipore, EUA) utilizando una membrana de celulosa de 30kDa (Millipore, EUA) manteniendo una presión positiva con aire a 5 psi. La primera etapa de purificación fue una cromatografía de intercambio aniónico en una columna XK16 (GE Healthcare, EUA) empacada con la resina Q Sepharosa Fast Flow (GE Healthcare, EUA). Para la carga de la proteína en la columna se utilizó un buffer 30 mM Tris pH 6.16 a un flujo de 2 mL/min en el equipo FPLC Akta Prime (Amersham Pharmacia Biotech, EUA). El pH del buffer de carga fue de 6.16 que es el punto isoeléctrico (pI) teórico de la proteína VP6. La proteína VP6 no interactúa con la resina Q sepharosa fast flow por lo que bajo estas condiciones de separación se recolectó el

eluato (pico 1), el cual fue concentrado por medio de ultrafiltración en un equipo AMICON (Millipore, EUA) con una membrana de 30 kDa con presión positiva con aire a 5 psi. La siguiente etapa de purificación fue exclusión molecular. El pico 1 concentrado se inyectó a una columna empacada con la resina HW65F (Tosoh, EUA) cuyo tamaño de poro es de 100 nm, lo que permite que los nanotubos eluyan en el volumen vacío de columna, mientras las proteínas sin ensamblar y otros contaminantes pasan a través de los poros de la resina. El volumen total de columna fueron 400 mL y se utilizó un buffer de 30 mM Tris pH 8.0. Durante toda la corrida cromatográfica se mantuvo un flujo constante de 2.5mL/min. Para todas las corridas cromatográficas se utilizó un sistema FPLC (AKTA *Prime*, Amersham Pharmacia Biotech, EUA) acoplado a un sistema de adquisición de datos PrimeView (AKTA *Prime*, Amersham Pharmacia Biotech, EUA). El purificado de nanotubos de VP6 se concentró por ultrafiltración en un equipo AMICON (Millipore, EUA) con una membrana de 30 kDa y se le adicionó 0.05% de azida de sodio para su almacenaje a 4°C.

4.6. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL

Se utilizó el método de Bradford para placas de 96 pozos (Bio-Rad, México). La curva de calibración se preparó utilizando BSA a una concentración de 1 mg/mL. El rango de concentraciones utilizados para llevar a cabo la curva de calibración fue entre 5 y 100 µg/mL. Todas las mediciones se realizaron por triplicado. Se colocaron 150 µL de muestra en cada uno de los pozos por 50 µL de reactivo de Bradford y se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente (Bradford, 1976). Posterior a la incubación, se midió absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas (FLUOstar Omega, BMG Labtech, EUA).

4.7. CARACTERIZACIÓN DE NANOTUBOS DE VP6 Y PROTEÍNA VP6 DESENSAMBLADA

4.7.1. SDS-PAGE Y WESTERN BLOT

Se determinó la pureza de la proteína VP6 purificada (nanotubos de VP6) por medio de geles desnaturizantes de SDS-PAGE al 12%, teñidos con azul de Comassie. La corrida electroforética se realizó utilizando amperaje constante a 15 mA para un gel o 30 mA para dos geles. Para determinar la identidad de la proteína se realizaron Western blots. La transferencia a la membrana de polifluoruro de vinidileno (PVDF) se realizó utilizando amperaje constante a 400 mA en un sistema semiseco con una fuente de poder modelo 493 (ISCO, EUA) durante 2 horas. La proteína fue detectada utilizando un suero antirotavirus- cepa NCDV (reconoce a la proteína VP6 nativa o desnaturizada) o el anticuerpo monoclonal antiVP6 255 (reconoce a la proteína nativa ensamblada), ambos a una dilución 1:4000 en PBS-T. Se utilizó una dilución de 1:2000 (en PBS-T) de los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa. Se reveló utilizando carbazol. El análisis densitométrico tanto de los geles SDS-PAGE como de los Western blot se realizaron con los softwares NIH ImageJ e Image Lab.

4.7.2. DESENSAMBLAJE DE NANOTUBOS DE VP6

Los nanotubos de VP6 fueron desensamblados incubándolos con 300 mM de CaCl₂ durante 6 horas a 27 °C con agitación constante. Se preparó un stock de CaCl₂ a una concentración de 10 M filtrado por 0.22µm (GPH Acrodisc, PALL, EUA). Para corroborar el completo desensamblaje de los nanotubos de VP6 las muestras se analizaron por cromatografía de permeación en gel utilizando HPLC (PG-HPLC), dispersión dinámica de luz (DLS) y microscopía electrónica de transmisión (MET).

4.7.3. PERMEACIÓN EN GEL POR HPLC (PG-HPLC)

Los nanotubos y la proteína VP6 desensamblada se analizaron por HPLC utilizando una columna de permeación en gel (PG) Ultrahydrogel 500 (7.8 mm diámetro interno y 30 cm de largo) (Waters, EUA), con el protocolo descrito por Mena et al. (2005) y Plascencia-Villa et al., 2011. Esta columna tiene un tamaño de poro de 50 nm.

Se utilizó el equipo HPLC Delta Prep 4000 marca WatersTM (Massachussets, EUA) con los siguientes componentes:

- Controlador Prep LC Waters
- Detector de fluorescencia Waters 2475 (λ_{ex} 484 nm y λ_{em} 510 nm)
- Detector de arreglo de diodos Waters 996 (λ 205-400 nm)
- Software Empower

Se utilizó flujo isocrático de 0.9 mL/min a 37°C y un buffer de corrida 10 mM Tris pH 8.0. Se calibró la columna utilizando diferentes estándares proteicos cuyo diámetro hidrodinámico era conocido. Se utilizaron lisozima, tiroglobulina, IgG, EGFP, albumina (todas a una concentración de 1 mg/mL) y esferas fluorescentes (FLuoSpheres, Life Technologies, EUA) de 100, 40 y 20 nm de diámetro (en diluciones de 1:100 y 1:1000 en el amortiguador 10 mM Tris pH 8.0). Se midió la absorbancia a 280 nm y 260 nm y la intensidad de fluorescencia a las longitudes de onda de excitación y emisión de aminoácidos aromáticos, λ_{ex} 280 nm y λ_{em} 350 nm, y a las longitudes de onda de excitación y emisión de las esferas fluorescentes, λ_{ex} 505 nm y λ_{em} 515 nm. Se utilizó azida de sodio para determinar el volumen total de columna (V_t). El volumen vacío de columna se determinó por la elución de las esferas fluorescentes de 100 nm (V_0). Para determinar el coeficiente de partición (K_D) se utilizó la siguiente ecuación:

$$K_D = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad (\text{Ecuación 5})$$

En donde V_e es el volumen de elución de la proteína.

4.7.4. MEDICIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA POR DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ

Se empleó el equipo de dispersión dinámica de luz Zetasizer nano-Zs (Malvern Instruments Ltd, Inglaterra) equipado con un láser de 633 nm. Las mediciones se realizaron utilizando una celda de cuarzo con un paso óptico de 3 mm. Todas las mediciones se realizaron a una temperatura fija de 25°C y un tiempo de equilibrio de 2 minutos. Las posiciones de lectura de la celda y nivel de atenuación (0-100%) usados se ajustaron automáticamente por el software del equipo (Zetasizer software 6.01).

4.7.5. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Las muestras se colocaron en rejillas (200 mesh FCF200-Cu) cubiertas con Formvar/carbono (Electron Microscopy Sciences, EUA). Se depositaron 10 µL de muestra sobre la rejilla y se dejó interactuar durante 5 minutos, posteriormente se secó con un papel filtro y se adicionó una solución de acetato de uranilo al 4% durante 3 o 5 minutos y se lavó la rejilla con agua MQ, se secó y se almacenó. Las muestras se prepararon 24 horas antes del análisis al microscopio. Las observaciones se realizaron en los microscopios electrónicos de transmisión Zeiss EM 900 (Zeiss, Alemania) y JEM-1011 (Jeol, Japón) ambos operados a 80kV a magnificaciones desde 3,500 hasta 250,000 X.

4.7.6. ESPECTROFLUORIMETRÍA

Se determinaron los espectros de fluorescencia de la proteína VP6 con el espectrofluorímetro Ls55 (Perkin Elmer Instruments, EUA) a las longitudes de onda de excitación de 295 nm para triptófano (Trp) y 280 nm para Trp y Tirosina (Tyr). Se realizaron mediciones puntuales de la emisión de fluorescencia, así como barridos de emisión de fluorescencia desde 300 nm a 600 nm a una velocidad de 50 nm/min. La temperatura de la celda se mantuvo constante en 27°C utilizando un termorecirculador

(Lauda-Königshofen, Alemania). La apertura del monocromador de excitación y emisión fue de 2.5 nm en todas las mediciones. Se analizaron las muestras de VP6 ensamblada en tubos, así como desensamblada a diferentes concentraciones de proteína, desde 40 $\mu\text{g/mL}$.

4.8. OXIDACIÓN *IN VITRO*

Después de llevar a cabo la purificación y caracterización de la proteína, la VP6 ensamblada o desensamblada fue sometida a oxidación en tres condiciones de reacción:

- a) Oxidación con peróxido. Se agregó H_2O_2 para obtener concentraciones desde 50 μM hasta 10 mM.
- b) Oxidación catalizada por metales (MCO) a una concentración de FeCl_2 constante. Se realizó la reacción de Fenton con 150 μM de FeCl_2 a concentraciones de H_2O_2 desde 100 μM hasta 10 mM.
- c) MCO a concentración equimolar de FeCl_2 y H_2O_2 . Las concentraciones de FeCl_2 y H_2O_2 fueron de 100 μM a 10 mM.

Los tiempos de incubación con los oxidantes fueron de 1 y 6 horas a temperatura ambiente en agitación constante. Las proteínas oxidadas se analizaron por dispersión dinámica de luz y espectrofluorimetría. Además se determinó el centro de masa espectral de los espectros de fluorescencia de aminoácidos aromáticos, se cuantificaron los productos carbonilados y por PG-HPLC se evaluó el desensamblaje de los nanotubos. En paralelo, se trabajó también con la albúmina sérica bovina (BSA) para comparar nuestros resultados con aquellos ya reportados en la literatura para esa proteína. Se utilizó un stock de proteína BSA de 1 mg/mL en buffer 30 mM Tris pH 8.0. En algunos experimentos fue necesario ajustar la fuerza iónica adicionando NaCl a las muestras.

4.8.1. CENTRO DE MASA ESPECTRAL DE FLUORESCENCIA

Se determinaron los espectros de emisión de fluorescencia como se indica en la sección 4.7.6. para cada una de las muestras sometidas a oxidación y se calculó el centro de masa

espectral de fluorescencia. El centro de masa espectral (CME) nos indica cambios en el espectro de fluorescencia que es posible correlacionarlos con cambios en el ambiente hidrofóbico e hidrofílico de los cromóforos de las proteínas. Se calcula con la siguiente ecuación:

$$CME = \frac{\sum_{280}^{600} URF \cdot \nu_i}{\sum_{280}^{600} URF} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Donde ν_i es el número de onda (inverso de la longitud de onda) y URF las unidades relativas de fluorescencia.

4.9. CUANTIFICACIÓN DE LA CARBONILACIÓN EN PROTEÍNAS

Se utilizaron dos acercamientos para llevar a cabo la detección y cuantificación de carbonilos en la proteína. Ambos acercamientos aprovecharon la reacción de la 2-4 dinitrofenilhidrazina (DNPH) con los productos carbonilados de la proteína. Primero, se utilizó el kit Oxyblot™ (Millipore, EUA) que consiste en la detección de los aductos carbonilados por Western blot. Posterior a la oxidación de la proteína (VP6 desensamblada, ensamblada y BSA) se tomaron 5 µg totales de proteína (en 5µL) para la derivatización. Las muestras se desnaturalizaron adicionándoles 10 µL de una solución de SDS al 12%. Después de la etapa de desnaturalización la muestra de proteína es derivatizada adicionándole 10 µL de una solución de DNPH (kit Oxyblot™). La derivatización procedió durante 15 minutos y la reacción se detuvo con la solución de neutralización. La reacción de derivatización no debe proceder por más de 30 minutos. Finalmente, a la muestra ya derivatizada se le adicionó 1 a 1.5 µL de una solución de β-mercaptoetanol al 5%. Las muestras derivatizadas se pueden almacenar a 4°C durante una semana. Las muestras son cargadas en geles al 12% SDS-PAGE para su separación y posterior transferencia a membranas de PVDF. Los aductos carbonilados son detectados utilizando el anticuerpo primario que reconoce a los aductos carbonilados a una dilución de 1:150 en PBS-T. La incubación con el anticuerpo primario (kit Oxyblot™) se dejó toda la noche ya que a

tiempos menores de incubación con el anticuerpo la intensidad de las bandas observadas era mínima. Se utilizó un anticuerpo secundario (kit Oxyblot™) a una dilución 1:300 en PBS-T. Se reveló utilizando una solución de carbazol.

Debido a los inconvenientes y limitaciones de esta técnica, se decidió utilizar otro acercamiento, ahora cuantitativo. Para cuantificar los carbonilos presentes en la proteína antes y después de llevar a cabo la oxidación se implementó el protocolo utilizado por Levine et al. (1994), con algunas modificaciones (Guedes et al., 2009). Dentro de las modificaciones que se realizaron al protocolo original se encuentra la reducción de la cantidad de proteína total utilizada, ya que generalmente se utilizan entre 0.5 y 1 mg de proteína total por reacción. Adicionalmente, tomando en consideración lo realizado por Guedes y colaboradores (2009), se redujo la cantidad de solución de derivatización de DNPH. Como proteína de referencia se utilizó a la proteína BSA. Se preparó un stock de BSA con una concentración de 4 mg/mL. Para llevar a cabo cada medición se tomaron solamente 40 µg de proteína total. Las muestras se incubaron durante 1 hora con 160 µL de una solución 10 mM de DNPH (2,4-dinitrophenylhydrazine) disuelto en 2.5 M de una solución de HCl a temperatura ambiente en oscuridad. Las muestras se agitaron utilizando vortex (DAIGGER, EUA) cada 15 minutos. Posterior a la incubación con DNPH, las muestras se lavaron dos veces con ácido tricloroacético (TCA) al 20% y se colocaron en hielo durante 20 minutos. Posteriormente, se centrifugaron durante 20 minutos a 20,000 x g para separar el precipitado proteico del sobrenadante. El precipitado proteico se resuspendió en una solución de etanol/acetato de etilo (1:1, v/v) para remover el exceso sin reaccionar de DNPH. Se realizaron 3 lavados con la solución de etanol/acetato de etilo utilizando un volumen de 160 µL de dicha mezcla en cada lavado. Entre cada etapa de lavado se centrifugó la muestra durante 20 minutos a 20,000 x g para separar la proteína precipitada del sobrenadante. El precipitado proteico final fue resuspendido en 20 µL de una solución 6 M de hidrocloreto de guanidina y se incubó durante 10 minutos a 37°C con agitación constante (Thermomixer, EUA). Se midió absorbancia a 280 nm y 370 nm con el equipo nanodrop (Thermo Scientific, EUA). El contenido de carbonilos se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar de la dinitrofenilhidrazona que es 22,000 M⁻¹ cm⁻¹ (λ=370 nm) (Levine et al., 1994).

4.10. DETERMINACIÓN DE BITIROSINAS POR ESPECTROFLUORIMETRÍA

Las bitirosinas son productos de la oxidación de dos moléculas de tirosinas contiguas/cercanas ya sea de la misma proteína o de diferentes moléculas. La formación de bitirosinas puede observarse fácilmente debido a que se excitan a una longitud de onda característica λ_{ex} de 315 nm. Debido a esto, se utilizó el espectrofluorímetro LS55 (Perkin Elmer Instruments, EUA) para medir el espectro de fluorescencia excitando a una λ_{ex} de 315 nm y adquiriendo datos de emisión de fluorescencia desde los 320 nm hasta 600 nm. La temperatura de la celda de cuarzo (Perkin Elmer Instruments, EUA) se mantuvo constante a 27°C utilizando un termo-recirculador (Lauda-Königshofen, Alemania). La apertura del monocromador de excitación y emisión se mantuvo a 2.5 nm para todas las mediciones.

4.11. RE-ENSAMBLAJE DE PROTEÍNA OXIDADA

Los nanotubos de VP6 se desensablaron incubándolos con 300 mM de CaCl_2 durante 6 horas a 27 °C. Las muestras de proteína desensamblada se analizaron por PG-HPLC y dispersión dinámica de luz (DLS) para confirmar su desensamblaje. Se utilizaron muestras a una concentración de 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína para cada reacción (1mg total). Después de desensamblar la proteína, ésta se oxidó con varias concentraciones de oxidante (100, 250, 500, 1000, 5000 y 10,000 μM de H_2O_2) durante 6 horas. Para re-ensamblar VP6, la proteína se diluyó 1:10 con una solución 100 mM de NaHCO_3 pH 8.0, para precipitar el calcio. La muestra diluida se centrifugó a 12,000 x g durante 10 minutos para remover el precipitado y se concentró por ultrafiltración con una membrana de 10 kDa en un equipo AMICON (Millipore, EUA) utilizando presión positiva de 5 psi con aire. Este procedimiento se realizó 3 veces. La muestra se llevó a un volumen final de 1 mL y se analizó por DLS, PG-HPLC y microscopía electrónica. Sobre el trabajo de ensamblaje/re-ensamblaje de VP6 se encuentran dos manuscritos en preparación, Mena et al. y Rodríguez et al.

4.12. DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO INTRACELULARES

Se utilizó el fluoróforo H₂DCFDA (Molecular Probes, Life Technologies, EUA). Se evaluaron diferentes concentraciones de fluoróforo para cargar las células (10µM, 20µM, 30µM y 50 µM). El fluoróforo se disolvió en dimetilsulfóxido para obtener alícuotas de una concentración no mayor a 50mM y se almacenó a -70°C. Se incubaron células Sf9 y High Five[®] a una concentración celular de 0.5x 10⁶ cel/mL durante 30 minutos con las diferentes concentraciones de fluoróforo (10-50 µM). Las células después de cargarse con el fluoróforo se centrifugaron a 1,000 x g durante 3 minutos y se reemplazó el medio con fluoróforo por medio nuevo. Las células cargadas con el fluoróforo se analizaron por microscopia de fluorescencia, así como por espectrofluorimetría a las longitudes máximas de excitación (495 nm) y de emisión (520 nm) de H₂DCFDA. También se analizó la capacidad de producción de proteína recombinante de las células cargadas con el fluoróforo H₂DCFDA.

Se realizaron experimentos añadiendo un agente oxidante, 50mM de H₂O₂ a las células ya cargadas para observar los valores máximos de intensidad de fluorescencia que podrían obtenerse debido a estrés oxidativo. Para llevar a cabo el análisis de las cinéticas de producción de EROs se tomaron muestras cada 2 horas durante las primeras 12 horas y posteriormente cada 24 horas, de cultivos de células cargadas con fluoróforo. Se analizó viabilidad celular y concentración celular para cada uno de los tiempos. Todos los cultivos realizados partieron de una concentración celular viable de 0.5 x 10⁶ cel/mL. Para el análisis de fluorescencia en espectrofluorímetro se mantuvo una concentración celular de 0.5 x 10⁶ cel/mL para los diferentes experimentos.

4.13. CUANTIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS

Se utilizó HPLC de fase reversa (RP-HPLC) utilizando una columna C18 para separar los aminoácidos. Se utilizó un kit comercial marca Waters el cual contiene el fluoróforo 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamato que reacciona con el grupo amino de los aminoácidos. Se preparó una muestra estándar de aminoácidos que tuviera los siguientes

aminoácidos a una concentración de 100 pmol/ μ L: ácido aspártico, ácido glutámico, serina, asparagina, glicina, glutamina, histidina, treonina, arginina, alanina, prolina, triptofano, cisteína, cistina, tirosina, valina, metionina, lisina, y fenilalanina. Para determinar la identidad de cada uno de los aminoácidos se inyectaron mezclas en donde se incrementó la concentración de uno de los aminoácidos de la mezcla. Para las muestras problema de proteína VP6 se realizó un tratamiento de hidrólisis ácida durante 24 horas. Las muestras se derivatizaron de la siguiente forma: se colocaron 10 μ L de solución de aminoácidos o muestra problema, 70 μ L de buffer de boratos (Water, EUA) y 20 μ L del fluoróforo y se incubó durante 10 minutos a 55 °C. La corrida cromatográfica se realizó utilizando un buffer 230 mM de Acetato de sodio, 15 mM trietanolamina, pH 5.1 con un flujo de 1 mL/min a 37 °C. El gradiente de elución se realizó utilizando acetonitrilo. Para llevar a cabo la separación de los aminoácidos se realizó un gradiente con las siguientes características: Se equilibró la columna durante 6 minutos con el buffer de corrida y se formó el gradiente lineal de 0% hasta 83% de acetonitrilo en 40 minutos. Posteriormente se lavó durante 10 minutos a 100% de acetonitrilo. Las muestras fueron analizadas con el detector de fluorescencia con una λ_{ex} de 250 nm y una λ_{em} de 395 nm. Se realizaron curvas de calibración de cada uno de los aminoácidos para determinar su concentración y el rango lineal para su cuantificación.

Capítulo 5

Resultados y discusión

5.1. EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y EROS EN CÉLULAS DE INSECTO POR ESPECTROFLUORIMETRÍA

Para determinar el efecto del estrés oxidativo en las células de insecto fue necesario encontrar el rango de concentración de H₂O₂ que no fuera letal para las células. Existen reportes en la literatura que demuestran que concentraciones muy bajas de H₂O₂ provocan un incremento en la proliferación celular, y que al aumentar la concentración de H₂O₂ inician los daños sub-letales y daños letales (Gülden et al., 2010). Se realizaron cultivos de células High Five (sin infectar) a diferentes concentraciones de H₂O₂ (0, 50, 100 y 1000 µM). Se midió la concentración y la viabilidad celular a lo largo de los cultivos (Fig. 9). Como se puede observar, a concentraciones de H₂O₂ de 100 y 1,000 µM se observaron cambios en las cinéticas de crecimiento. A la concentración de H₂O₂ de 100 µM, las células se duplicaron hasta las 48 horas alcanzando una concentración de 2 x 10⁶ cel/mL. Por otra parte, a 1,000 µM se observó una fase lag más larga que en los demás cultivos. Se calcularon las velocidades específicas de crecimiento de los diferentes cultivos (μ), las cuales fueron 0.031 h⁻¹ para la condición sin H₂O₂, con 50 µM y 100 µM. A 1,000 µM, el μ disminuyó a 0.027 h⁻¹. Los valores de μ en este trabajo son similares a los ya reportados (Palomares et al., 2006; Rivas, 2013). Además, no se observaron cambios morfológicos en las células tratadas con las diferentes concentraciones de peróxido, como se puede observar en la Figura 10. Hambarde y colaboradores (2013) observaron que las células de insecto Sf9 son entre 50-100 más radioresistentes que células humanas, lo que podría explicar la resistencia al ser tratadas con 1 mM de H₂O₂.

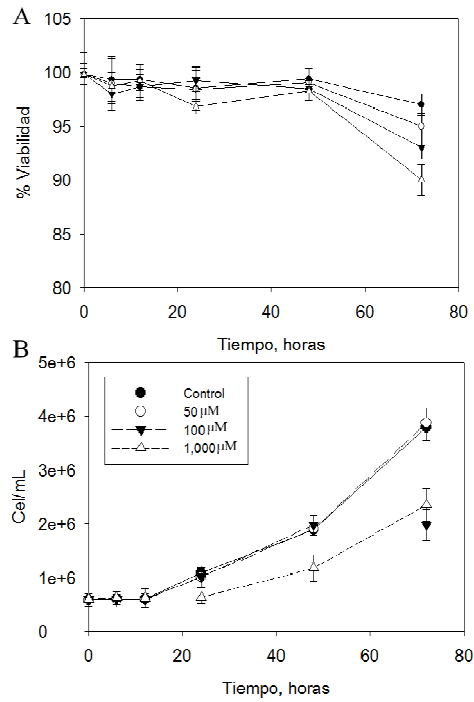


Fig. 9. La adición de H₂O₂ en cultivos de células High Five afecta el crecimiento celular y su viabilidad. A) Viabilidad celular y B) concentración celular viable. Experimentos por triplicado.

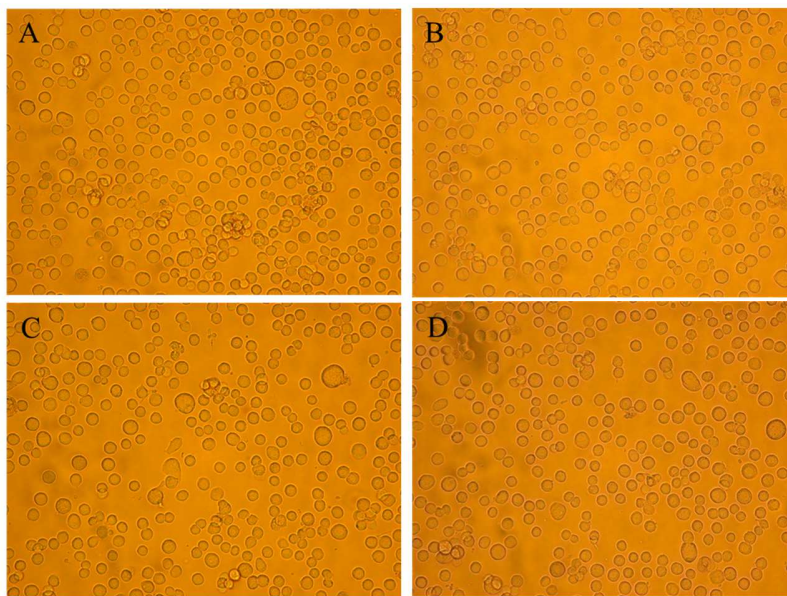


Fig. 10. La adición de H₂O₂ en cultivo de células High Five no afecta la morfología. A) Control, B) 50 μM H₂O₂, C) 100 μM H₂O₂ y D) 1000 μM H₂O₂. Todas las fotografías son de cultivos a las 24 horas después de la adición del peróxido.

Para llevar a cabo la visualización de las EROs a nivel celular se utilizó el fluoróforo H₂DCF-DA. La molécula de H₂DCF-DA puede permear la membrana celular pero sólo aquellas moléculas de H₂DCF-DA oxidadas son fluorescentes (Dikalov y Harrison, 2014). El objetivo de este experimento era observar la producción de EROs en las células a lo largo del cultivo, para lo que era necesario cargar a las células con el fluoróforo e incubar el cultivo durante días. Las células Sf9 se cargaron con H₂DCF-DA y se visualizaron en el microscopio de fluorescencia (Figura 11). Para observar una mayor intensidad de fluorescencia, las células cargadas se incubaron con H₂O₂. Se evaluaron diferentes concentraciones de H₂DCF-DA con la finalidad de determinar la concentración ideal de trabajo. Como se observa en la Figura 11, a concentraciones de 50 μ M de H₂DCF-DA (Figura 11D), el ruido de fondo en las fotografías tomadas por el microscopio de fluorescencia fue demasiado alto. En todas las concentraciones utilizadas se observó fluorescencia dentro de las células debido a la oxidación del H₂DCF-DA, por lo que se decidió utilizar la concentración de 20 μ M en las posteriores determinaciones, concentración también recomendada por el fabricante (Life Technologies, EUA).

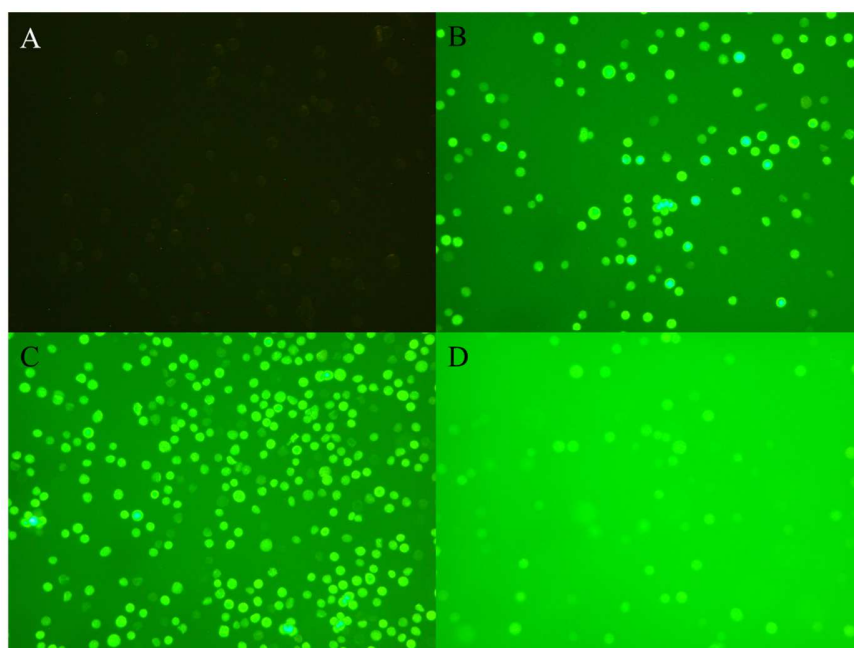


Figura. 11. Microscopía de fluorescencia de células Sf9 cargadas a diferentes concentraciones de H₂DCF-DA y tratadas con 50mM H₂O₂. A) Células no cargadas. B) 10 μ M H₂DCF-DA. C) 20 μ M H₂DCF-DA. D) 50 μ M H₂DCF-DA.

Se siguieron las cinéticas de crecimiento de las células cargadas y sin cargar, con el fin de evaluar si el fluoróforo afecta el crecimiento celular (Figura 12). Como control positivo se incubaron células Sf9 cargadas con 50 mM de H_2O_2 (Figura 12B). Se observó que la carga de H_2DCF -DA (Figura 12A) no genera un daño a las células, ya que el cultivo sin cargar con H_2DCF -DA (Figura 12C) y el cultivo con H_2DCF -DA tuvieron la misma cinética de crecimiento. Las células a las cuales se les adicionó H_2O_2 solamente se duplicaron hasta una concentración celular de 0.9×10^6 cel/mL y su viabilidad decayó rápidamente (Figura 12B).

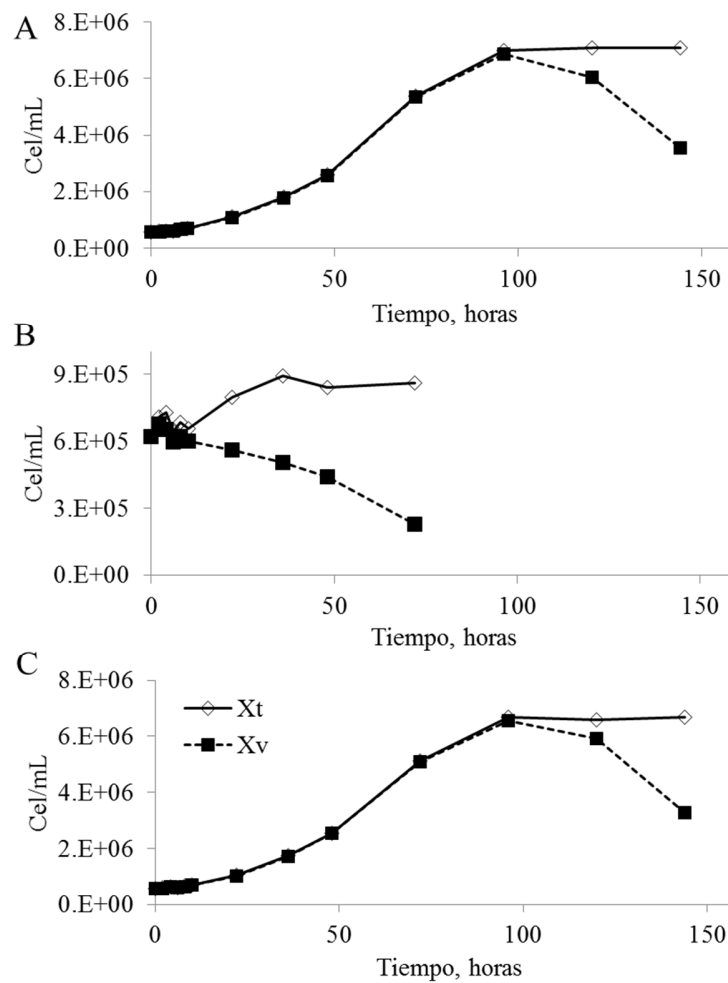


Figura 12. La adición de H_2DCF -DA a células en cultivo no cambia su cinética de crecimiento. En línea continua se muestra la concentración total de células y en línea punteada la concentración de células viables. A) Células cargadas, B) Células cargadas con la adición de 50mM H_2O_2 , C) Células sin cargar. Xv, concentración de células viables y Xt, concentración de células totales. Experimentos únicos.

Además, se evaluó la intensidad de fluorescencia en estos cultivos (Figura 13). En todas las mediciones se utilizó la misma concentración de células viables (0.5×10^6 cel/mL). Se observó que la intensidad de fluorescencia por célula no incrementó conforme transcurrió el cultivo, sino que disminuyó. El comportamiento esperado era observar un incremento gradual en la intensidad de fluorescencia debido a la oxidación progresiva de H₂DCF-DA a lo largo del cultivo, así como un incremento súbito en la intensidad de fluorescencia en aquellos cultivos a los cuales se les adicionó H₂O₂. El incremento esperado en la intensidad de fluorescencia de las células que fueron incubadas con H₂O₂ fue 5 veces mayor al comparado con el cultivo sin H₂O₂. En el cultivo de células cargadas pero sin la adición de H₂O₂ se puede observar una caída en la intensidad de fluorescencia por célula, la cual puede deberse a que las células que se duplicaron no contienen el fluoróforo.

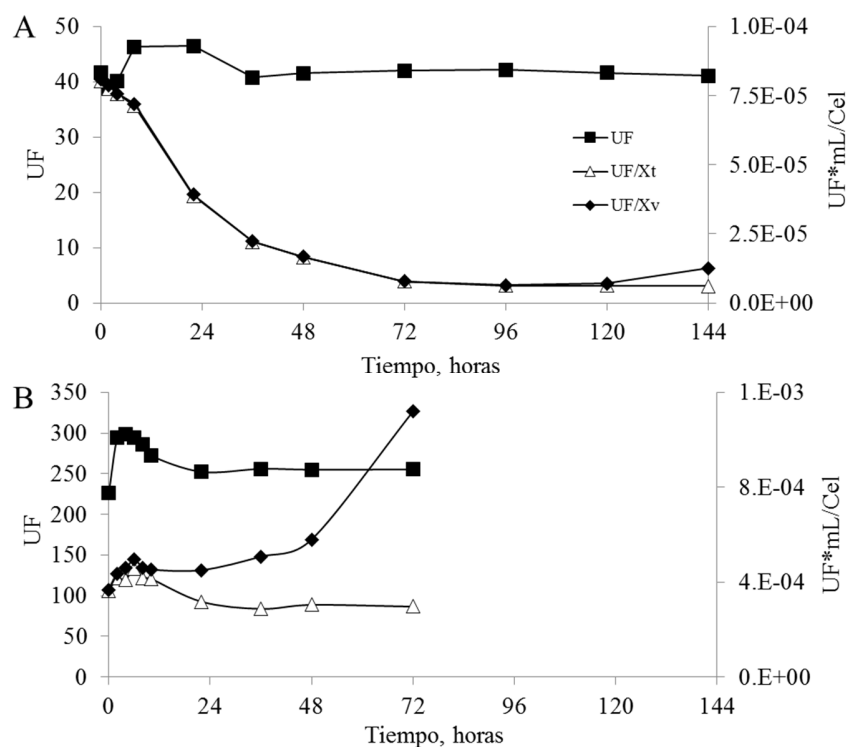


Figura 13. Intensidad de fluorescencia de H₂DCF-DA durante las cinéticas de crecimiento de cultivos de células SF9 cargadas. A) Células cargadas sin la adición de H₂O₂, B) Células cargadas con 50mM H₂O₂. UF, unidades de fluorescencia; Xt, concentración celular total; Xv, concentración celular viable. Experimentos únicos.

Para determinar si las células cargadas con el fluoróforo tienen la capacidad de producir proteína recombinante, células cargadas con H₂DCFDA se infectaron con bacVP6 como se

describe en Materiales y Métodos. Las cinéticas de infección se muestran en la Figura 14. El comportamiento de las células cargadas infectadas fue similar al observado para las células sin cargar infectadas (Figura 14B).

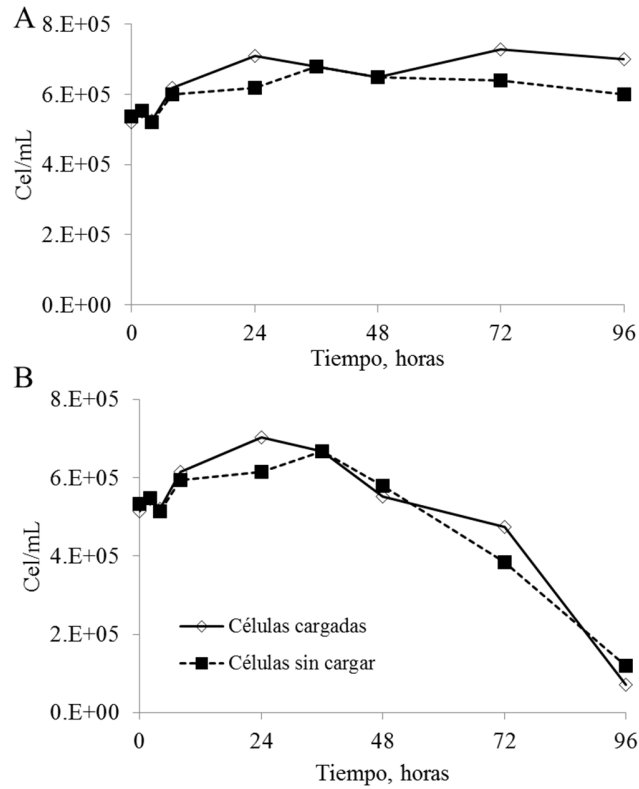


Figura 14. Cinéticas de crecimiento de células Sf9 infectadas con bacVP6 a una MDI de 1 ufp/cel. A) Células totales. B) Células viables. Las células cargadas con H₂DCF-DA e infectadas siguen una misma cinética de crecimiento que las células sin infectar. Experimentos únicos.

Después de la infección, las células dejaron de crecer y la viabilidad (Figura 14A y 14B) disminuyó por debajo del 30% alrededor de las 80 horas post infección. En ambos cultivos se midió la fluorescencia de H₂DCF-DA de las células cargadas (Figura 15). No se observó un incremento en la fluorescencia total de las células cargadas después de la infección, sino una ligera caída en la intensidad de fluorescencia alrededor de las 24 horas de cultivo, lo que puede indicar la degradación del fluoróforo. Por medio de Western blot se evaluó la producción de VP6 en las células cargadas con el fluoróforo H₂DCF-DA y se comparó con células sin cargar también infectadas con bacVP6 (Figura 16). No se observó diferencia en la producción en ambos cultivos. Las muestras de pellet celular no analizadas se analizaron. Por lo tanto, el fluoróforo H₂DCF-DA cargado en las células no interfirió en la producción

de proteína recombinante, pero es necesario analizar con mayor detalle si el fluoróforo nos permitirá llevar a cabo la medición adecuada de la producción de EROs en los cultivos.

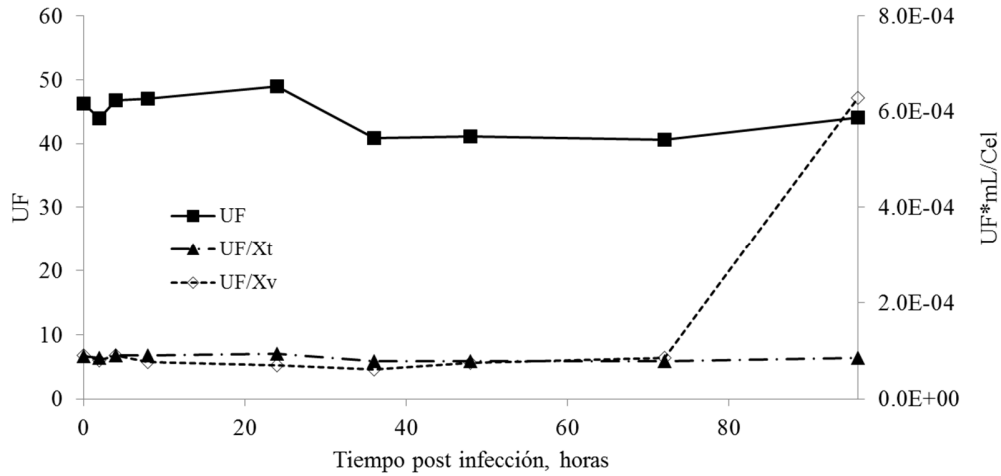


Figura 15. Cinética de intensidad de fluorescencia de H₂DCF-DA en células Sf9 infectadas con bacVP6 a una MDI de 1 ufp/cel. UF, unidades de fluorescencia; UF/Xt, unidades de fluorescencia por células totales; UF/Xv, unidades de fluorescencia por células viables. Experimentos únicos.

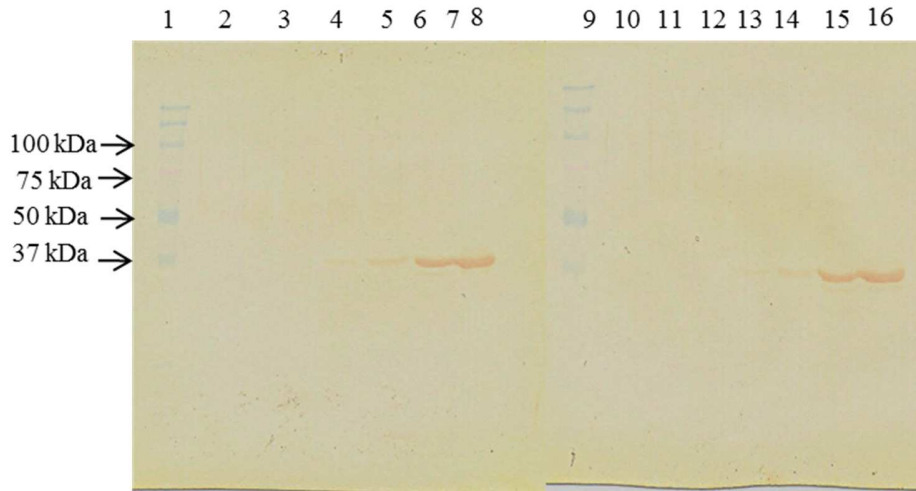


Figura 16. Análisis de la producción de VP6 en sobrenadante por Western blot. Carriles 1-7, Sobrenadante del cultivo de células cargadas. Carriles 8-15, Sobrenadante del cultivo de células sin cargar. El cultivo se infectó al tiempo cero. 1) Marcador de peso molecular, 2) 0 horas, 3) 24 horas, 4) 48 horas, 5) 72 horas, 6) 96 horas, 7) VP6 purificada 1, 8) VP6 purificada 2, 9) Marcador de peso molecular, 10) 0 horas, 11) 24 horas, 12) 48 horas, 13) 72 horas, 14) 96 horas, 15 y 16) VP6 purificada.

Este esfuerzo fue para determinar las condiciones ideales para llevar a cabo las mediciones posteriores de estrés oxidante en células de insecto. Por ello, fue necesario analizar la fluorescencia de células cargadas con el fluoróforo H₂DCFDA al adicionarles H₂O₂ a

concentraciones sub-letales (Figura 17). A las muestras de células cargadas se les adicionó H_2O_2 a una concentración de $100 \mu\text{M}$ en el medio de cultivo (Figura 17). Se utilizaron además células sin cargar. Con este experimento se pretendían dos cosas, primero, determinar cambios en la intensidad de fluorescencia que pudieran correlacionar con la formación intracelular de EROs, y segundo, analizar si era posible medir especies reactivas de oxígeno de forma reproducible en intervalos largos de tiempo. En el capítulo anterior, en las Figuras 11 y 13, ya habíamos observado diferencias en el comportamiento en la intensidad de fluorescencia, y por ello se decidió realizar dicho experimento, ahora con concentraciones sub-letales.

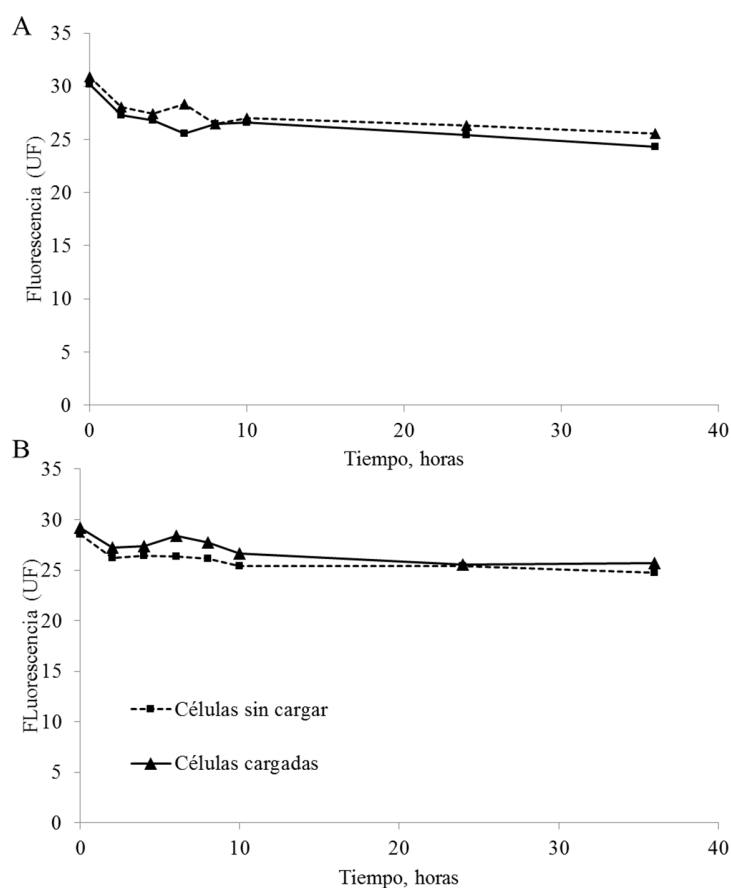


Fig. 17. Análisis de intensidad de fluorescencia de células High Five cargadas con $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ sometidas a condiciones sub-letales de estrés oxidante. A los cultivos se les adicionaron concentraciones diferentes de H_2O_2 . A) $100 \mu\text{M}$ de H_2O_2 . B) 1 mM de H_2O_2 . El cultivo de células de insecto bajo las condiciones experimentales utilizadas presenta autofluorescencia probablemente debido a autofluorescencia del algún componente del medio de cultivo. Experimentos únicos.

Como se puede observar en la Figura 17A, la fluorescencia de las células cargadas y no cargadas fue similar. Lo que nos indica que la concentración de H_2O_2 podría ser un factor, y que no se está promoviendo un estado de estrés oxidante intracelular. Debido a esto, se decidió incrementar la concentración de H_2O_2 para determinar si fue debido a la concentración de oxidante, lo cual quedó descartado (Figura 17B). Uno de los posibles escenarios que nos planteamos, fue una mala carga del fluoróforo en las células, pero como se observa en la Figura 9, las células si fluorescen. Para descartar que el fluoróforo fuera el problema, se utilizó una alícuota nueva proporcionada gentilmente por el Dr. Luis Cárdenas (IBT-UNAM). Todas las muestras se observaron al microscopio de fluorescencia, en donde se observó que efectivamente se encontraban cargadas con el fluoróforo ya que se observó fluorescencia. En todas las condiciones analizadas, no se observó un incremento en la fluorescencia debido al H_2O_2 . El comportamiento observado en las gráficas de la pérdida en fluorescencia durante las primeras horas de cultivo ya había sido observado anteriormente (Figura 13).

En este trabajo, esta metodología no nos permitió medir de forma reproducible los niveles de EROs en células. Dentro de las limitantes importantes de esta metodología, fue que no nos permitió realizar cinéticas de producción de EROs a lo largo del tiempo (más de 24 horas), por varias razones. Primero, porque las células sin infectar se duplican y las células hijas podrían no tener el fluoróforo cargado y por ende, no fluorescer al momento de recibir un estrés. Segundo, el tiempo de vida media reportado para el fluoróforo se encuentra dentro de un rango de 1 hora y 36 horas (Life Technologies, EUA) por lo que podría degradarse. La posible degradación del fluoróforo podría explicar la pérdida de intensidad de fluorescencia que observamos en las Figuras 15 y 17.

Ya que no fue posible obtener resultados satisfactorios al utilizar H_2DCFDA , es necesario implementar otro tipo de metodologías que nos permitan evaluar la producción de EROs en tiempos largos de cultivos (más de 12 horas), sin tener la necesidad de sacar a las células de la condición de estrés a la cual están siendo sometidas. Se podrían implementar el uso de diferentes fluoróforos, un sistema de monitoreo del estado redox en el cultivo o en su defecto, la medición de marcadores de estrés oxidante como peroxidación de lípidos, o carbonilación de proteínas. Estos dos últimos, no miden la presencia de EROs pero indicarían cambios en el estado oxidativo.

5.2. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE VP6

Como se describió en Materiales y Métodos, se utilizaron diferentes medios de cultivo para producir la proteína VP6 de rotavirus en la línea celular High Five[®], con la finalidad de determinar en cuál de los medios de cultivo se obtenía la mayor producción de nanotubos de VP6 (VP6_{NT}). La descripción detallada de estos experimentos y sus resultados se encuentran plasmados en la tesis de licenciatura de Marco Rivas (2013). La producción de VP6_{NT} fue mayor y de mejor calidad en los medios PSFM y Express Five[®] (se considera como calidad a la formación de nanotubos de VP6), mientras que en medio ExCell 405[®], aunque se produce una gran cantidad de proteína recombinante, sólo fue posible obtener agregados de VP6 (Rivas, 2013). Es importante señalar que la proteína agregada obtenida de la producción de VP6 en medio ExCell 405[®] tiene la capacidad de re-ensamblarse en VP6_{NT} pero los rendimientos finales de producción de nanotubos (NT) son mucho menores a los obtenidos para los otros medios de cultivos mencionados en este trabajo. A manera de ejemplo, se muestra en la Figura 18 una cinética de infección de células High Five[®] en medio Express Five[®]. Como se observa, mientras el cultivo sin infectar creció hasta alcanzar concentraciones celulares cercanas a los 5×10^6 cel/mL, el cultivo infectado no se duplica y alrededor de las 48 horas post infección inicia una caída en la viabilidad celular debido a la infección por baculovirus (Palomares et al., 2006; Plascencia-Villa et al., 2011; Rivas, 2013). La viabilidad decae por debajo del 50% alrededor de las 96 horas.

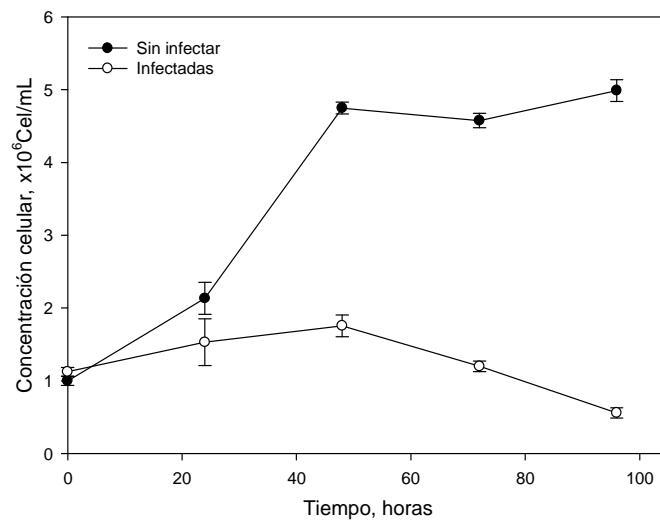


Figura 18. Cinética de crecimiento de células High Five® en medio Express Five, infectadas con bacVP6. También se muestra la cinética de crecimiento de células High Five® sin infectar a manera de comparación. Cultivos por duplicado.

El cultivo se cosechó y se purificó como se describe en Materiales y Métodos (Figura 19) y que se describe con mayor detalle en Plascencia-Villa et al., 2011 (Anexos). En la Figura 19A se muestra un cromatograma típico de la purificación por intercambio aniónico. El pico 1 de la Figura 19A corresponde a la elución de la proteína VP6, la cual bajo las condiciones de separación utilizadas en este trabajo no interacciona con la columna. Esta primera etapa de purificación permite remover una gran cantidad de contaminantes, entre ellos material genético, baculovirus y proteína de baculovirus, principalmente gp64 (pico 2). En la etapa de permeación en gel, como se puede observar en el cromatograma de la Figura 19B, se lograron separar 3 picos característicos de las muestras procedentes de intercambio aniónico. En el pico 3 es donde se observa la elución de la proteína VP6_{NT}, en el pico 4, se encuentra una gran cantidad de VP6 en su forma monomérica y trimérica (desensamblada, VP6_U) y otras proteínas contaminantes (alrededor de un 30%) y en el pico 5 proteínas de muy bajo peso molecular (también contaminantes). Los nanotubos recolectados del pico 3 se concentraron hasta una concentración de 0.4 mg/mL.

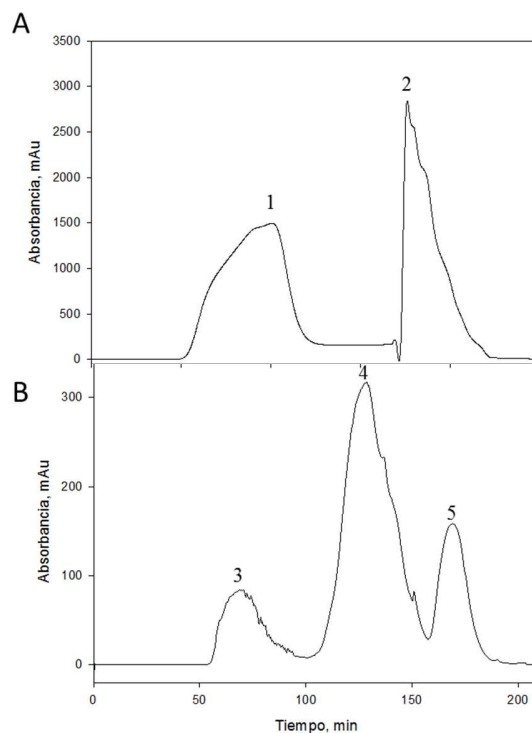


Figura 19. Etapas cromatográficas en la purificación de VP6 de rotavirus. A) Cromatografía de intercambio iónico (IEX). B) Cromatografía de permeación en gel (PG). La proteína VP6 se encuentra principalmente en el pico 1 de IEX. Los nanotubos de VP6 se obtienen en la pico 3 que se observa en el cromatograma de PG. Los picos 4 y 5 contienen VP6 no ensamblada y otras proteínas.

5.3. CARACTERIZACIÓN DE NANOTUBOS DE VP6

Las muestras de nanotubos obtenidos al final del proceso de purificación (pico 1) se caracterizaron para determinar su pureza, abundancia de macroestructuras (PG-HPLC, Mena et al., 2005), tamaño (dispersión dinámica de luz, DLS), fluorescencia de aminoácidos aromáticos (Tyr y Trp) y microscopía electrónica de transmisión (MET) (Figura 20).

El análisis por SDS-PAGE comprobó que la pureza de VP6 fue mayor del 95%. Por medio de PG-HPLC se determinó que el porcentaje de proteína ensamblada en nanotubos fue mayor del 95% (pico 1, Figura 20B). El pico 2 en la Figura 20B corresponde a VP6 desensamblada y el pico 3 a sales. Para calcular los coeficientes de partición (K_D) se calibró la columna como se describe en Plascencia et al. (2011). La observación en el MET mostró nanotubos (Figura 20C). La VP6 ensamblada en nanotubos ($VP6_{NT}$) fue desensamblada a

su forma trimérica/monomérica (VP6_U) como se describe en Materiales y Métodos, y analizada por espectroscopía de fluorescencia y DLS (Figura 20D y 20F, respectivamente).

Para posteriores experimentos fue necesario desensamblar VP6_{NT} como se describe en Materiales y Métodos. Después de la incubación con CaCl₂, la muestra de VP6_U fue analizada por PG-HPLC (Figura 21A), DLS (Figura 20E) y microscopía electrónica de transmisión (Figura 21B). En el cromatograma de PG-HPLC se observa que después de incubar a los VP6_{NT} (Pico 1, línea punteada) con calcio, los nanotubos se desensamblan a estructuras de menor tamaño (pico 2, línea continua), VP6_U. En el cromatograma de VP6_U también se observa una pequeña proporción (menos del 15%) del pico 1 que correspondería a estructuras con tamaño mayor a 50 nm, lo que puede deberse a la formación de agregados (Mena et al., en preparación, Rodríguez et al., en preparación). Por MET se observó la presencia de agregados en la muestra (Figura 21B).

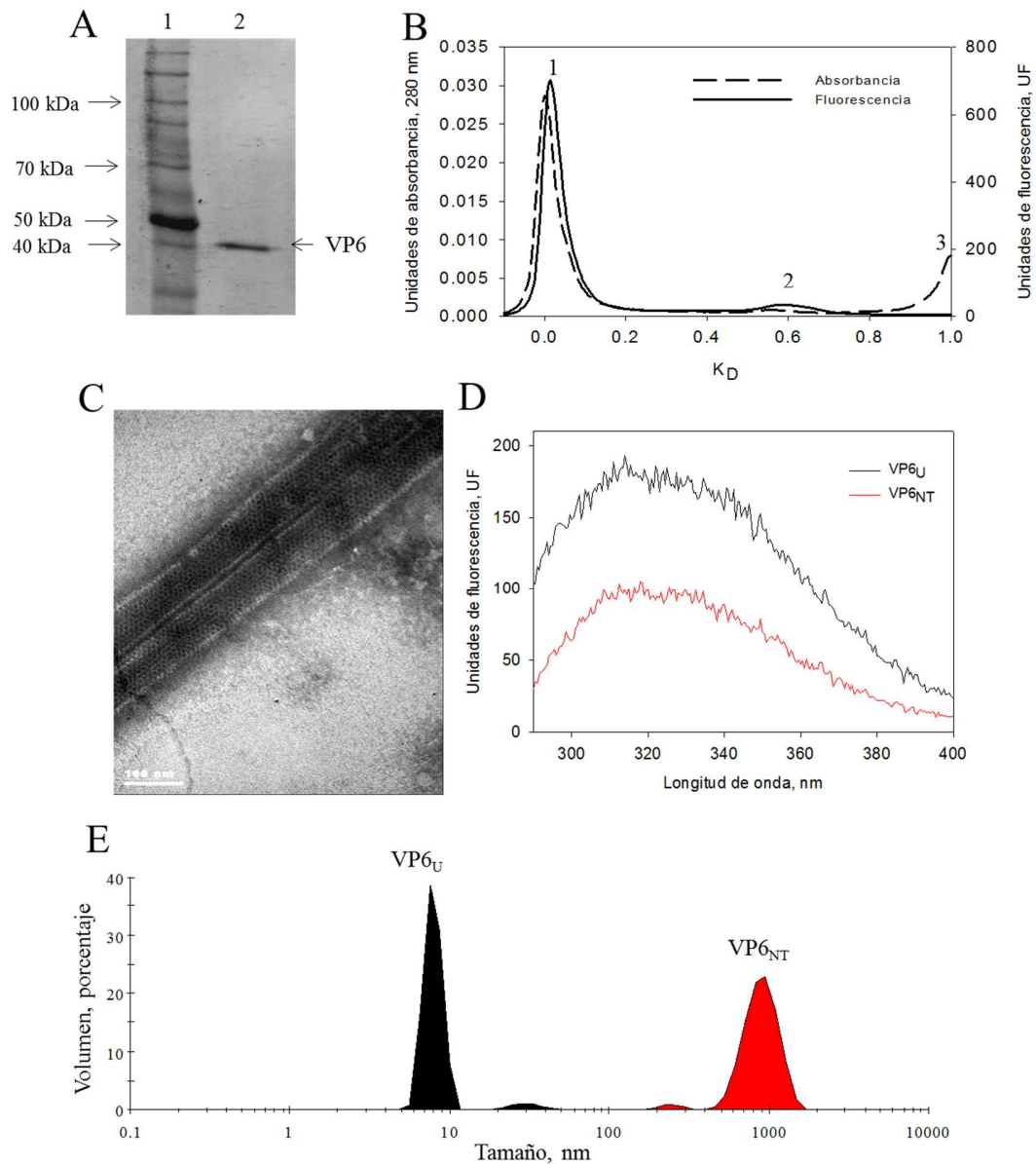


Figura 20. Caracterización de los nanotubos de VP6. A) Gel desnaturalizante al 12%. Carril 1, marcador de peso molecular Benchmark y carril 2 VP6 purificada. B) PG-HPLC de la muestra de nanotubos purificados, pico 1 nanotubos, pico 2 proteína desensamblada, pico 3 sales del buffer. C) MET de nanotubos purificados observados a una amplificación de 85K. D) Espectros de fluorescencia de aminoácidos aromáticos (Tyr y Trp) de nanotubos y VP6 desensamblada. E) Análisis de dispersión dinámica de luz de la muestra de nanotubos y VP6 desensamblada.

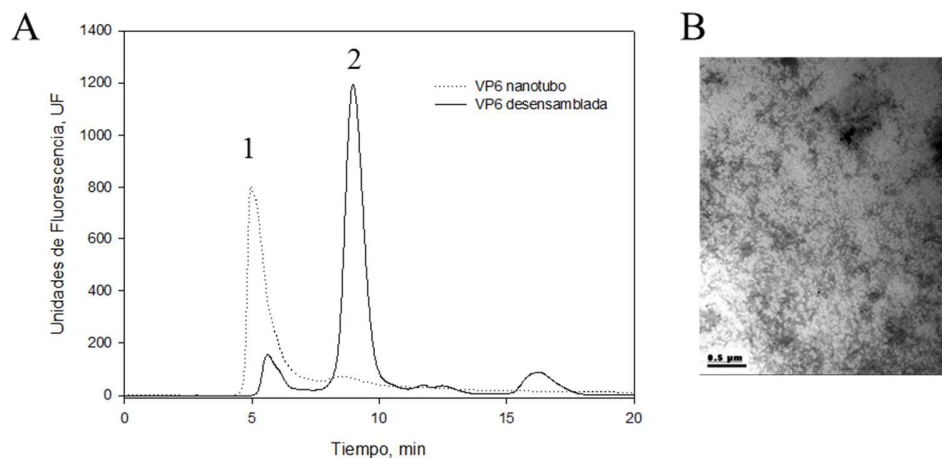


Figura 21. Análisis por PG-HPLC y MET de VP6 ensamblada en nanotubos y desensamblada. A) Cromatografía de permeación en gel por HPLC de VP6_{NT} y VP6_U. Se midió la fluorescencia de aminoácidos aromáticos a una λ_{ex} de 280 nm y una λ_{em} de 350 nm. B) MET de VP6_U.

La eficiencia cuántica de VP6_U fue 2.5 veces mayor que la de VP6_{NT} (Figura 20D). Al analizar el espectro de fluorescencia de Trp se observó una diferencia similar en la eficiencia cuántica entre VP6_U y los nanotubos (anexos, Figura A1). Esta diferencia puede deberse a la mayor cantidad de aminoácidos aromáticos expuestos en la proteína no ensamblada. Ya se ha reportado que diferencias en la exposición de residuos aromáticos al solvente producen cambios en el rendimiento cuántico, así como en la longitud de onda de máxima emisión, lo que permite identificar cambios específicos en las interacciones entre las proteínas y su plegamiento (Edwards y Silva, 1986).

El tamaño promedio de los nanotubos se determinó por DLS y fue mayor de 800 nm (diámetro de una esfera con tamaño equivalente). Por otra parte, el tamaño de VP6_U fue similar al reportado para el trímero, ~7nm (Mathieu et al., 2001).

5.4. SDS-PAGE Y CARBONILACIÓN DE PROTEÍNA

Se realizaron reacciones de oxidación en las condiciones descritas en Materiales y Métodos (con H₂O₂ (a) o con MCO a una concentración de FeCl₂ constante (b)). Las condiciones de reacción se eligieron con base en los trabajos de Davies y Delsignore (1987) y de Guedes et

al. (2009), quienes estudiaron la oxidación de BSA. Ellos observaron la desaparición de la banda de BSA en geles SDS-PAGE cuando BSA fue oxidada, y determinaron que la desaparición de la banda es provocada por la degradación de la proteína. BSA es la proteína más estudiada en condiciones de oxidación debido a sus propiedades fisiológicas como antioxidante natural en el torrente sanguíneo (Berlett et al., 1996; Bourdon y Blache, 2001; Roche et al., 2008). En este trabajo se analizó en paralelo con VP6 para tener un punto de comparación con la literatura. Las proteínas tratadas con las diferentes condiciones de oxidación se analizaron por SDS-PAGE en condiciones desnaturizantes y no desnaturizantes. Solo se muestran los datos obtenidos en condiciones desnaturizantes. En la Figura 22 se muestran los resultados del análisis densitométrico de los geles SDS-PAGE. La oxidación con H₂O₂ durante 6 horas no provocó una disminución en la intensidad de las bandas de BSA, VP6_{NT} y VP6_U. Por otra parte, cuando la proteína fue sometida a MCO, se observó una pérdida gradual en la intensidad de la banda de BSA a partir de 100 μM de H₂O₂ y la pérdida casi total de la intensidad de la banda a 5 mM de H₂O₂. La caída de intensidad de la banda de VP6_U se observó solo a 10 mM de H₂O₂. VP6_{NT} no se degradó después de una hora de MCO. Para observar un mayor daño oxidante, se incubaron las muestras durante 6 horas, observándose la degradación prácticamente completa de BSA desde la concentración de 100 μM de H₂O₂, mientras que fue necesaria una concentración mayor a 5 mM de H₂O₂ para la degradación completa de VP6_U y VP6_{NT}. En los anexos se muestran los geles teñidos con Coomassie de las muestras oxidadas por MCO (anexos, Figura 2A). Estos primeros experimentos mostraron que VP6 ensamblada es menos susceptible a la oxidación que VP6_U y BSA, por lo que el ensamblaje protege a la proteína de la oxidación. Además, se mostró que la oxidación con solo H₂O₂ no degrada a VP6. También se caracterizaron los espectros de fluorescencia, en los que tampoco se observaron cambios en la intensidad ni en el centro de masa espectral después de la oxidación de VP6 con solo H₂O₂ (anexos, Figura 3A). Ya que la oxidación con H₂O₂ no provocó daño en VP6, los siguientes experimentos se realizaron solo con MCO.

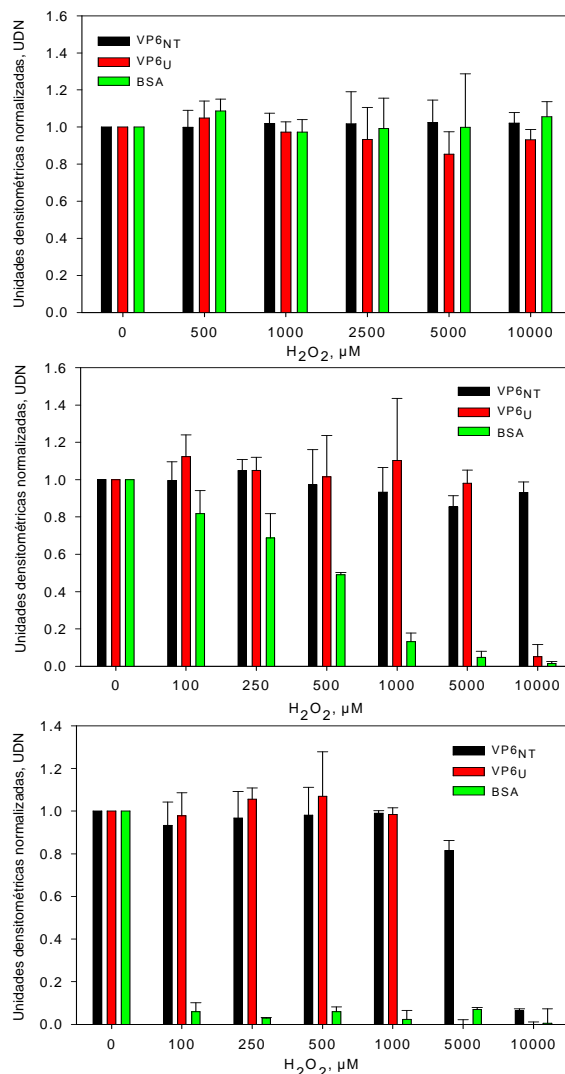


Figura 22. Intensidad de las bandas en los geles SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes de BSA, VP6_U y VP6_{NT} a diferentes tiempos de oxidación. A) Oxidación con H₂O₂ durante 6 horas. B) Oxidación con MCO durante 1 hora. C) Oxidación con MCO durante 6 horas. Las barras de error indican la desviación estándar del triplicado de los experimentos.

Por otra parte, se decidió implementar un protocolo para cuantificar los productos carbonilados en las proteínas como una medida del daño oxidante. La carbonilación es un producto estable de la oxidación que ha sido ampliamente utilizado para medir el grado de oxidación en las proteínas (Headlam y Davies, 2004; Federova et al., 2013). Los amino ácidos más importantes como precursores de compuestos carbonilados son arginina, lisina, treonina y prolina, aunque también se ha observado la formación de compuestos carbonilados en histidina y cisteína debido a reacciones secundarias de oxidación por

lipoxidación, reacciones secundarias de carbonilación y glicoxidación (Stadtman y Levine, 2003; Maisonneuve et al., 2009; Møller et al, 2011). Para estandarizar el protocolo se llevó a cabo la oxidación de la proteína BSA por varios tiempos y concentraciones de H₂O₂ (MCO) (anexos, Figura 4A). Posteriormente, se llevó a cabo la oxidación de las proteínas (BSA, VP6_U y VP6_{NT}) a diferentes concentraciones de agentes oxidantes utilizando la condición de MCO no equimolar (b).

La concentración inicial de carbonilos de la proteína sin oxidar fue de 0.069 ± 0.023 molc/molp para VP6_{NT}, 0.059 ± 0.023 molc/molp para VP6_U y 0.167 ± 0.010 molc/molp para BSA. La oxidación provocó un incremento en la concentración de carbonilos siguiendo un comportamiento de saturación (Figura 23). En condiciones no equimolares, el contenido de carbonilos en la saturación fue dos veces mayor en VP6_U que en VP6_{NT}, mientras que la concentración de carbonilos en BSA fue similar a VP6_U. Adicionalmente, se llevaron a cabo las MCO a condiciones equimolares de H₂O₂ y FeCl₂ (condición de oxidación c) con el fin de observar el efecto de la oxidación provocada sólo por radicales •OH (Figura 23B). En las reacciones no equimolar hay limitación de la concentración de FeCl₂ (150 µM) y lo que resulta en la generación de otras especies oxidantes tales como, H₂O₂ y •OOH, además del •OH (Meucci et al., 1991; Baron et al., 2006). La oxidación en condiciones equimolares también siguió un comportamiento de saturación como en la condición no equimolar. En las condiciones equimolares se obtuvieron 64 veces más carbonilos en VP6_U y 5 veces más en VP6_{NT} que en las condiciones oxidantes no equimolares. Este incremento indica que la oxidación por solamente radicales •OH genera un mayor daño oxidante sobre la proteína, por lo que esta EROs sería más dañina que las otras producidas en condiciones no equimolares.

Los resultados obtenidos se ajustaron a la siguiente ecuación de saturación:

$$[C] = \frac{[C]_{\max} [H_2O_2]}{a + [H_2O_2]} \quad (\text{Ecuación 7})$$

en donde [C] corresponde a la concentración de carbonilos (molc/molp), [C]_{max} a la máxima concentración de carbonilos y *a* la constante de saturación. Los valores que se obtuvieron para cada una de las condiciones se muestran en la Tabla 3. Haciendo una

analogía con cinética enzimática, la constante de saturación a puede interpretarse como la susceptibilidad de la proteína a la oxidación o como la afinidad al oxidante. La mayor susceptibilidad de VP6_{NT} a la oxidación sugiera que aquellos aminoácidos expuestos al solvente en VP6_{NT} tienen una afinidad muy alta a los oxidantes. El contenido máximo de carbonilos fue dos veces mayor en VP6_U que en VP6_{NT}. En condiciones equimolares, el contenido máximo de carbonilos en VP6_U fue 14 veces mayor que en VP6_{NT}. Como ya se había observado anteriormente por SDS-PAGE, la proteína BSA fue más susceptible a la oxidación que la proteína VP6 tanto ensamblada como no ensamblada. Otros reportes en la literatura han demostrado que BSA es muy susceptible a ser oxidada (Berlett et al., 1996). Una de sus funciones en el torrente sanguíneo es el aceptar a las EROs y evitar que otras proteínas o moléculas sufran daños oxidantes (Berlett et al., 1996; Bourdon y Blache, 2001; Roche et al., 2008).

La diferencia obtenida en la susceptibilidad a la carbonilación entre BSA y VP6 podría explicarse por el contenido de residuos RPKT presentes en cada proteína, ya que BSA contiene 149 residuos/mol, mientras que VP6 contiene 82 residuos/mol. Además, BSA es una proteína que contiene 17 puentes bisulfuro en su estructura, lo que la hace más susceptible a la oxidación.

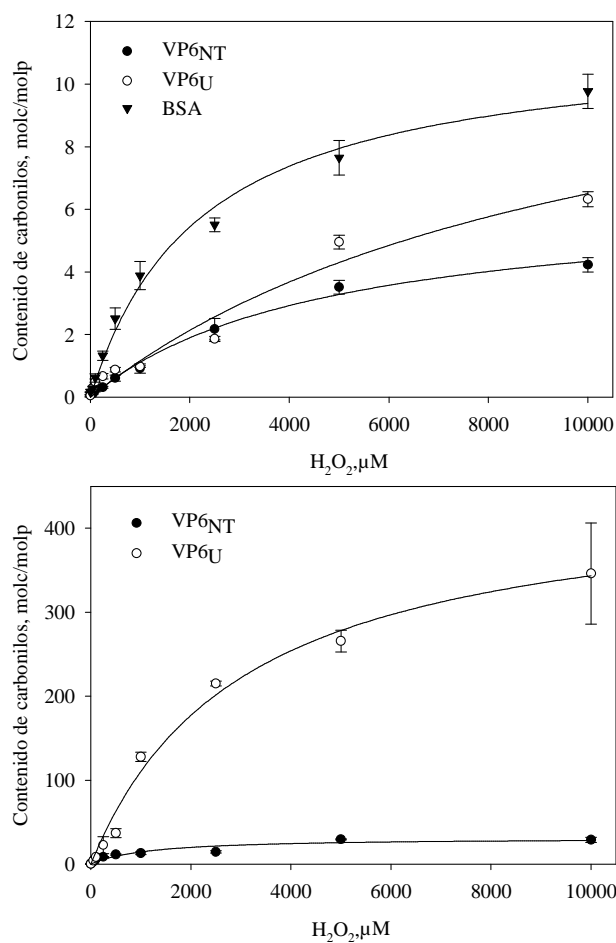


Figura 23. Contenido de carbonilos en BSA, VP6_U y VP6_{NT} a diferentes concentraciones de H₂O₂. A) Oxidación durante 1 hora con 150 μM de FeCl₂ variando la concentración de H₂O₂. B) Oxidación durante 1 hora con concentraciones equimolares de FeCl₂ y H₂O₂. Las líneas muestran el ajuste de la ecuación 1 con los parámetros que se listan en la Tabla 3. Experimentos por triplicado.

Tabla 3. Coeficientes del ajuste de la ecuación 7 sobre los datos de carbonilación a diferentes concentraciones de H₂O₂.

Muestra	[c] _{max} , mol/molp	a, μM	r ²
<i>Condición de oxidación b, no equimolar</i>			
VP6 _{NT}	6.40 ± 0.43	4,745.99 ± 681.64	0.99
VP6 _U	13.28 ± 3.72	10,431.12 ± 4824.19	0.97
BSA	11.47 ± 0.61	2,216.32 ± 324.21	0.99
<i>Condición de oxidación c, equimolar</i>			
VP6 _{NT}	31.49 ± 4.16	1,154.85 ± 499.22	0.89
VP6 _U	448.73 ± 32.19	3,064.28 ± 546.32	0.99

5.5. ANÁLISIS POR DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ DE VP6_{NT} Y VP6_U OXIDADAS

Uno de los efectos de la oxidación en proteínas más ampliamente reportados en ensayos *in vitro* es la agregación. Se utilizó el método de dispersión dinámica de luz para observar el tamaño de partículas contenidas en muestras de VP6_{NT} y VP6_U. Al oxidar VP6_{NT} (concentración de FeCl₂ constante), el tamaño de las partículas disminuyó conforme aumentó la concentración de H₂O₂, como se puede observar en la Figura 24A. La muestra de nanotubos sin oxidar tuvo un diámetro hidrodinámico de $1,067.0 \pm 206.6$ nm, el que disminuyó hasta 317.5 ± 40.41 nm a la concentración de 10,000 μ M de H₂O₂. Este cambio en el tamaño de partícula pudo ser debido a fragmentación o desensamblaje de los nanotubos. Las muestras oxidadas fueron observadas en el MET, mostró la presencia de proteína agregada y la desaparición de los nanotubos (Figura 24B). Por otra parte, la proteína VP6_U sin oxidar tuvo un diámetro hidrodinámico de 7.5 ± 2.6 nm, lo que concuerda con la literatura (Lepault et al., 2001). Posterior a la oxidación con 10,000 μ M de H₂O₂, el diámetro hidrodinámico se incrementó hasta $2,085.0 \pm 289.7$ nm (Figura 24B). Todas las muestras se observaron en el MET, lo que mostró la presencia de agregados (Figura 25C). El fenómeno de agregación ha sido descrito en varias proteínas bajo diferentes condiciones de oxidación y se han propuestos diferentes mecanismos que podrían explicarlo (Dalle-Donne et al., 2003; Auer et al., 2007; Mahler et al., 2009; Jeong et al., 2011). Entre las reacciones que pueden provocar la agregación se encuentran el cross-linking entre tirosinas (formación de bitirosinas), que ocurre por la formación del radical tirosilo (Giulivi y Davies, 1994). En este trabajo no se observó formación de bitirosinas en VP6_U y VP6_{NT} (Anexos Figura 5), por lo que la agregación pudo ser causada por otros mecanismos (Dalle-Donne et al., 2003; Auer et al., 2007; Mahler et al., 2009). Existen reportes en la literatura que atribuyen la agregación a los cambios hidrofóbicos que sufren las proteínas debido a la carbonilación (Dalle-Donne et al., 2003; Fedorova et al., 2013).

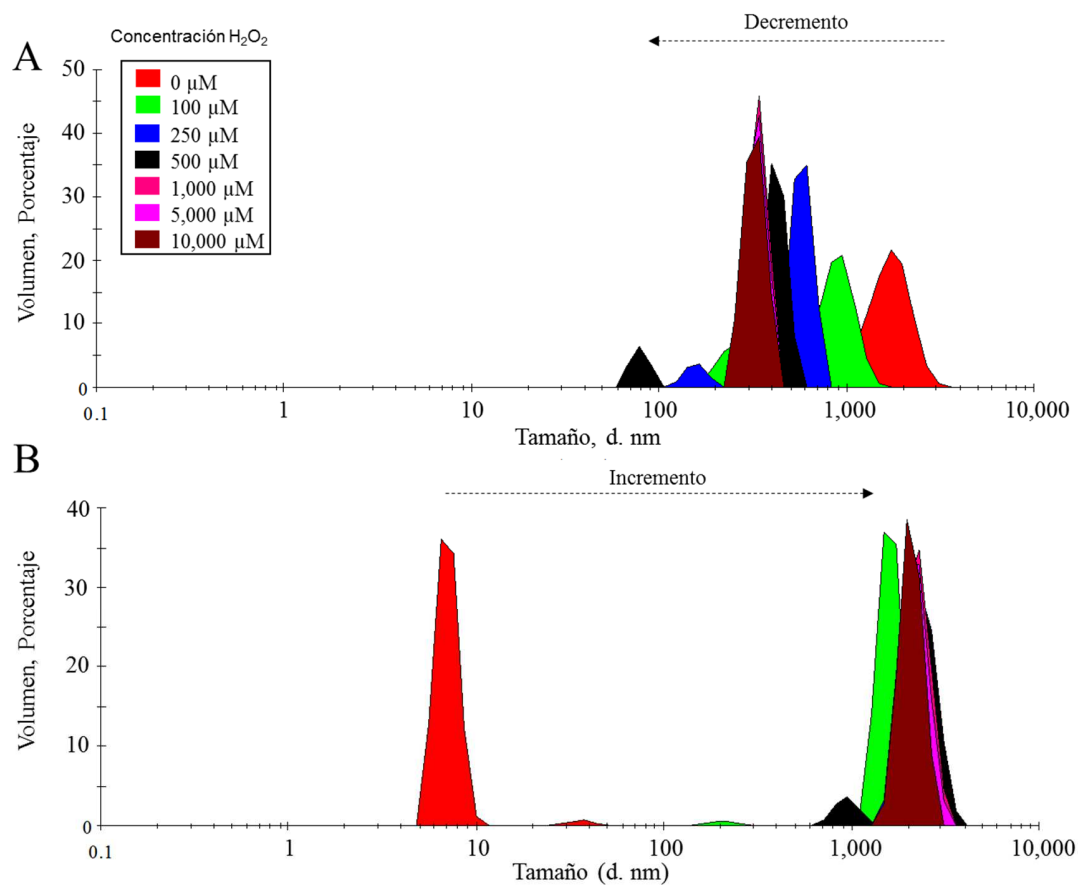


Figura 24. Análisis por dispersión dinámica de luz de VP6_{NT} y VP6_U oxidadas por MCO a diferentes concentraciones de H₂O₂. A) Oxidación de VP6_{NT}. B) Oxidación de VP6_U. Las flechas indican la dirección del cambio de tamaño de las estructuras analizadas.

Los dos fenómenos observados tanto para VP6_U (agregación) como para VP6_{NT} (desensamblaje) podrían tener un impacto muy importante para las aplicaciones de VP6, ya que la agregación ha sido correlacionada con cambios en la inmunogenicidad de proteínas (Tleuglabulova et al., 1999; Singh, 2011). Además, la presencia de nanotubos es requerida para su utilización en vacunación y en nanotecnología (Blazevic et al., 2011; Plascencia-Villa et al., 2011; Carreño-Fuentes et al., 2013; Pastor et al., 2014).

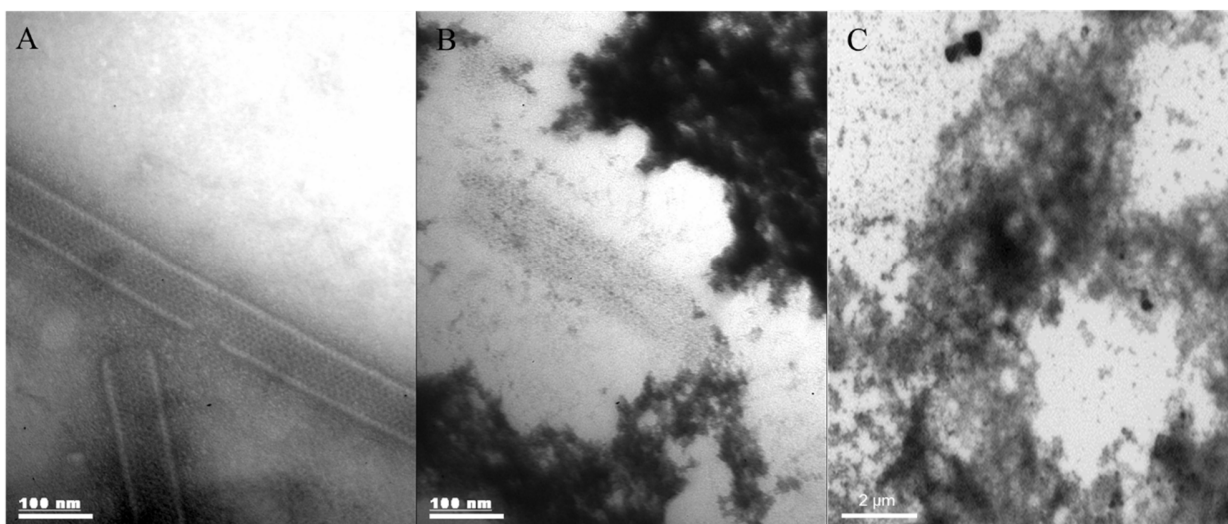


Figura 25. Micrografías electrónicas de transmisión de las muestras oxidadas por MCO de VP6_{NT} y VP6_U. A) VP6_{NT} control sin oxidar. B) Oxidación de VP6_{NT} a 10,000 μM de H_2O_2 . C) Oxidación de VP6_U a 10,000 de H_2O_2 . Las ampliaciones fueron de 140K para las micrografías mostradas en A y B y de 4.4K para la micrografía en C. Experimentos por triplicado.

5.6. ANÁLISIS DE PERMEACIÓN EN GEL POR HPLC Y ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA DE LAS MUESTRAS OXIDADAS DE VP6_{NT}

Con la finalidad de observar los productos de la oxidación de VP6_{NT}, se analizaron las muestras por PG-HPLC. En la Figura 26 se muestran los cromatogramas de absorbancia (Figura 26A) y fluorescencia de aminoácidos aromáticos (Figura 26B) de las muestras sometidas a MCO con diferentes concentraciones de H_2O_2 . No se observó cambio en el perfil cromatográfico de absorbancia a 280 nm hasta una concentración de 1 mM de H_2O_2 (Figura 18A). Cuando la proteína fue oxidada con 10 mM de H_2O_2 no se detectó absorbancia a 280 nm. Por otra parte, a diferencia de la absorbancia, la fluorescencia de aminoácidos aromáticos disminuyó 40% en la condición de oxidación de 100 μM de H_2O_2 y continuó decreciendo hasta desaparecer completamente a 10 mM (Figura 26B).

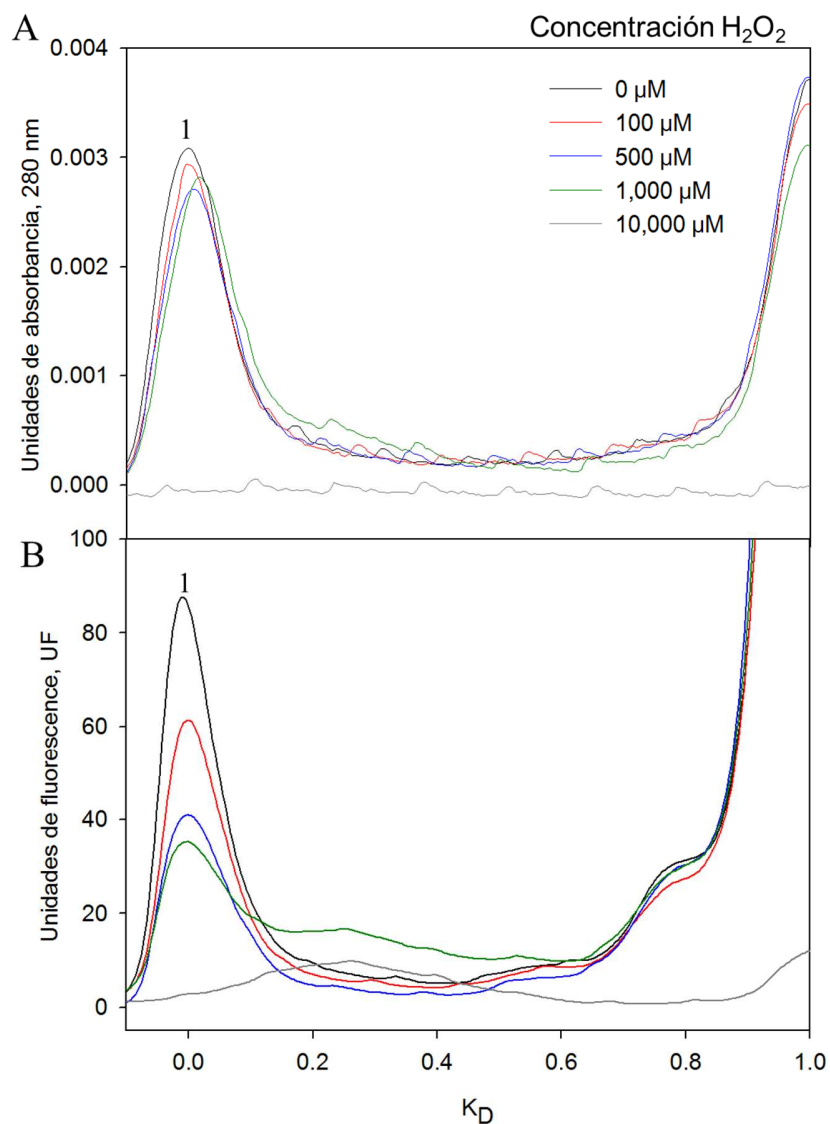


Figura 26. Análisis por PG-HPLC de muestras de VP_{6NT} oxidadas por MCO a diferentes concentraciones de H₂O₂. A) Cromatograma de absorbancia a 280 nm. B) Cromatograma de emisión de fluorescencia a 350 nm (excitación a 280 nm). Experimentos por triplicado.

No se observó un cambio en el perfil cromatográfico después de la oxidación porque los productos de la oxidación fueron mayores a 50 nm, que es el límite de exclusión de la columna utilizada. En el cromatograma de la Figura 26B se puede observar la aparición de picos en valores de K_D de 0.2 lo que podría deberse a una fracción desensamblada de VP_{6NT}, pero que en absorbancia no se observa. La pérdida de fluorescencia observada pudo deberse a la oxidación de los aminoácidos aromáticos, como reportaron Davies et al.

(1987), quienes comprobaron que la oxidación con $\bullet\text{OH}$ y $\bullet\text{OH} + \text{O}_2^{\bullet-}$ de BSA provoca modificaciones en el anillo aromático de Trp, resultando en derivados no fluorescentes. Con la finalidad de determinar si el cambio en la intensidad de fluorescencia se debía solamente a la oxidación de los aminoácidos aromáticos o si existían posibles cambios conformacionales en la proteína, se midieron los espectros de fluorescencia desde 290 nm hasta 600 nm de las muestras oxidadas de VP6_{NT} y VP6_U excitando a dos diferentes longitudes de onda, 280 nm (absorción de Trp y Tyr) y 295 nm (absorción de Trp) (Figura 27A y 27B). Se observó que la intensidad de fluorescencia disminuyó al aumentar la concentración de H₂O₂, tanto para VP6_{NT} como para VP6_U, como anteriormente se había observado por GP-HPLC para el caso de VP6_{NT}. A concentraciones mayores 100 μM de H₂O₂, aproximadamente el 50% de la intensidad de fluorescencia desapareció para ambas muestras. La fluorescencia decayó más pronunciadamente en la muestra de VP6_{NT}, debido probablemente a que los aminoácidos aromáticos expuestos son más susceptibles a ser oxidados. Con la finalidad de determinar posibles cambios en el ambiente hidrofóbico/hidrofílico de los aminoácidos aromáticos se calculó el centro de masa espectral con la ecuación 6. Los cambios en la CME están correlacionados con cambios en el microambiente que rodea a los aminoácidos aromáticos desde un ambiente hidrofílico (valores más pequeños de CME) hasta un ambiente más hidrofóbico (valores mayores de CME). Para tener un control de proteína completamente desplegada se incubó una muestra de VP6 con 6M de guanidina, lo que resultó en un CME de $27,642 \pm 136 \text{ cm}^{-1}$. Se calcularon los CME de VP6_{NT} y VP6_U oxidadas a las diferentes concentraciones de H₂O₂, observando una caída constante en el CME hasta 1 mM de H₂O₂, a valores similares a los de la proteína desplegada (Figura 27C), lo que indica que VP6 se desplegó totalmente en esta condición (Mohana-Borges et al., 1999; Vivian y Callis, 2001). Los cambios observados en la CME ante la oxidación indican que en todas las condiciones de oxidación utilizadas el ambiente en el cual los aminoácidos aromáticos se encuentran fue más hidrofílico conforme la concentración de H₂O₂ se incrementó hasta 1 mM de H₂O₂. Interesantemente, el CME de VP6_U a concentraciones mayores de 1mM de H₂O₂ aumentó, probablemente como resultado de la agregación, como se observó por DLS y ha sido previamente descrito (Mohana-Borges et al., 1999; Vivian y Callis, 2001; Lakowics, 2009).

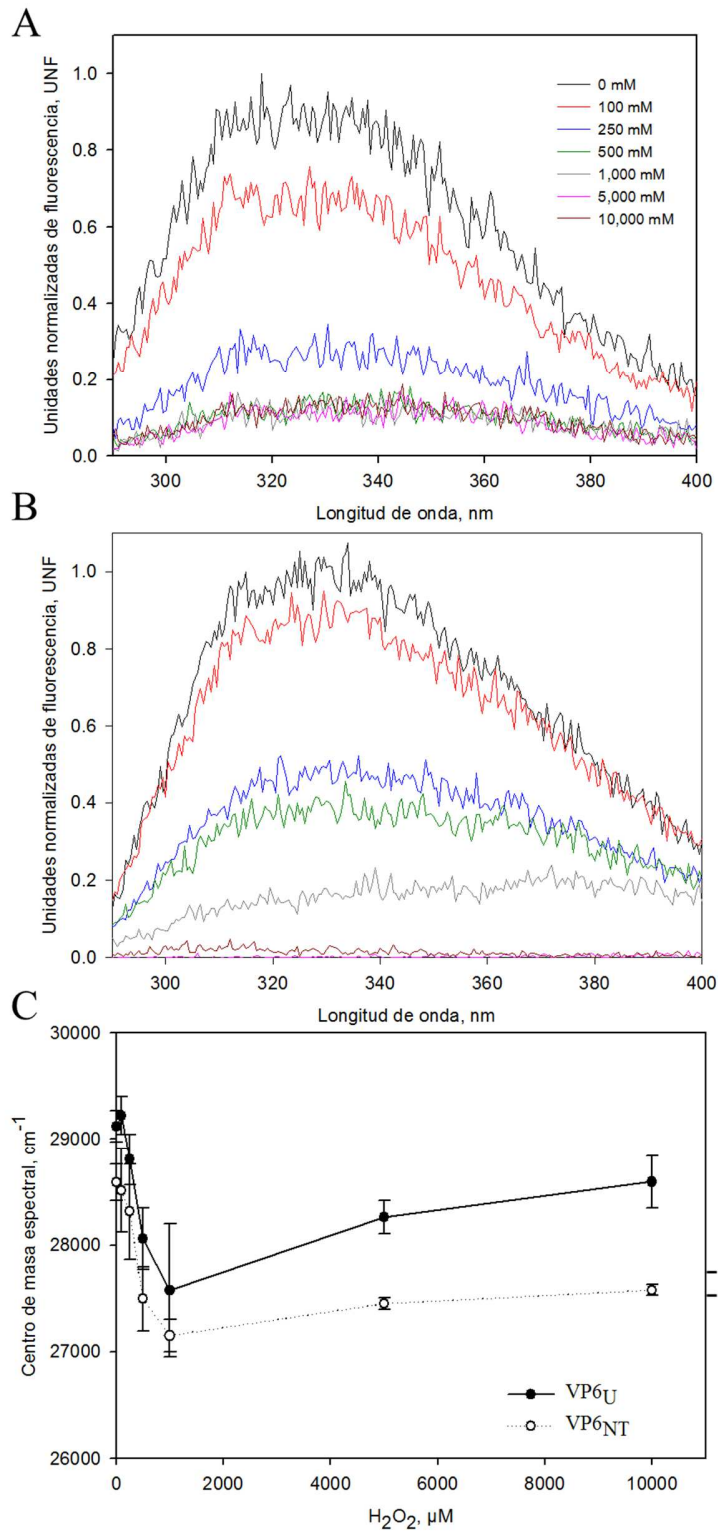


Figura 27. Análisis de las muestras oxidadas de VP6_{NT} y VP6_U por espectroscopia de fluorescencia. A) Espectro normalizado de fluorescencia de VP6_{NT}. B) Espectro normalizado de fluorescencia de VP6_U. C)

Centro de masa espectral graficado contra la concentración de H₂O₂. A la derecha de la gráfica C se muestra el CME obtenido para la muestra de VP6 desplegada con 6M de guanidina. Experimentos por triplicado.

5.7. RE-ENSAMBLAJE DE PROTEÍNA VP6_U OXIDADA

El ensamblaje de VP6 es un proceso espontáneo modulado por la concentración de iones calcio en la solución (Mathieu et al., 2001; Mena et al., en preparación; Rodríguez-González et al., en preparación). Para determinar si VP6_U oxidada aún tiene la capacidad de ensamblarse en nanotubos, se colocaron muestras de VP6_U oxidada en condiciones de re-ensamblaje (Figura 28A). Como control se utilizó VP6 sin oxidar y también VP6_U sin re-ensamblar ($K_D=0.6$). Como se observa en la Figura 28A, la abundancia del pico de macroestructuras disminuyó conforme la concentración de H₂O₂ aumentó, lo que indica que la presencia de macroestructuras (VP6_{NT}) es menor conforme incrementa la concentración de H₂O₂. La eficiencia de ensamblaje se calculó para cada una de las condiciones analizadas (como se detalla en el pie de la Figura 28). Se utilizó como control a VP6 sin oxidar, cuya eficiencia de ensamblaje fue del 72%. La eficiencia de ensamblaje decayó conforme la concentración de H₂O₂ se incrementó, hasta obtener valores por debajo del 35%. Como ya se había demostrado anteriormente, VP6_U oxidada tiende a agregarse, por lo que los valores obtenidos de eficiencia de ensamblaje podrían estar sobreestimados al comigrar en la columna los VP6_{NT} y agregados. La agregación podría explicar la disminución en la eficiencia de ensamblaje en nanotubos. Al observar las muestras en el MET se comprobó que conforme se incrementa la concentración de H₂O₂, la calidad de los nanotubos se ve comprometida, observándose nanotubos fisurados (Figura 29). Las fisuras observadas en los nanotubos pueden deberse a la formación de carbonilos u otros productos de oxidación en la proteína, que impiden el ensamblaje en nanotubos de forma eficiente generando zonas en donde la interacción entre proteínas es mucho menor y por ende, la generación de fisuras en el nanotubo. La disminución en la eficiencia de ensamblaje de VP6 se observó a concentraciones de H₂O₂ mayores de 100 μ M, y es probablemente el resultado de modificaciones de aminoácidos importantes para el ensamblaje de la proteína. Anteriormente, Erk y colaboradores (2003) demostraron que la modificación de la histidina 153 en la estructura de VP6 provoca la pérdida de ensamblaje en VP6_{NT}, pero no así la formación de trímeros.

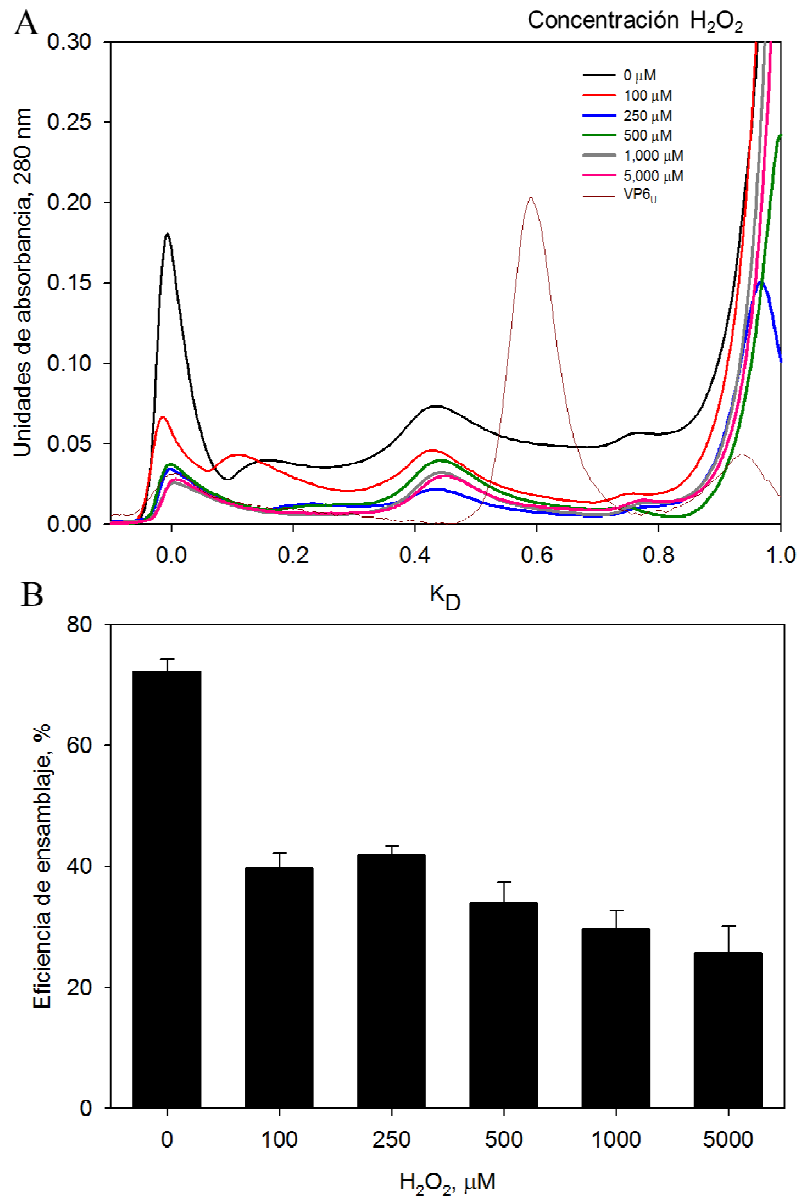


Figura 28. Re-ensamblaje de VP6_U oxidada con diferentes concentraciones de H₂O₂. A) Cromatograma de absorbancia a 280 nm utilizando una columna de permeación en gel. B) Eficiencia de ensamblaje cuantificada como el porcentaje de área bajo la curva del pico a 0 K_D contra el total de área del resto de los picos, excepto el pico con K_D de 1 (sales). Experimentos por duplicado.

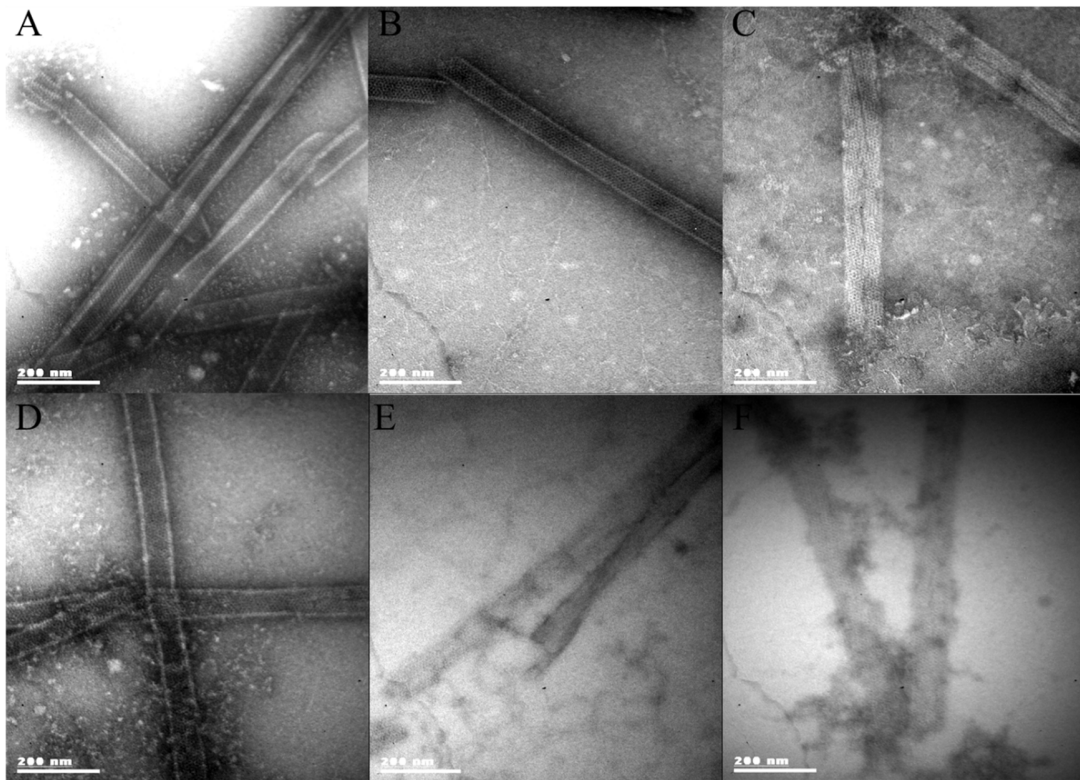


Figura 29. Observación por microscopía electrónica de transmisión de las muestras de VP6_U oxidadas a diferentes concentraciones de H₂O₂ y sometidas a las condiciones de ensamblaje de VP6_{NT}. A) Control sin oxidar. B) Oxidación con 100 μM de H₂O₂. C) Oxidación con 250 μM de H₂O₂. D) Oxidación con 500 μM de H₂O₂. E) Oxidación con 1,000 μM de H₂O₂. F) Oxidación con 5,000 μM de H₂O₂. Las muestras se observaron a una amplificación de 85,000X.

5.8. EVALUACIÓN DE LAS ETAPAS DE PURIFICACIÓN SOBRE LA OXIDACIÓN DE LA PROTEÍNA VP6.

El fenómeno de oxidación se puede presentar en distintas etapas de proceso provocando el deterioro en la calidad y estabilidad de las proteínas, y en nuestro caso particular, de la proteína recombinante producida. Los partes del proceso en los cuales se puede producir oxidación de proteínas son: en la célula productora, en la purificación y en el almacenamiento (Torosantucci et al., 2013). Dentro de las células, las proteínas están expuestas a una gran variedad de radicales libres que son altamente inestables (Davies et al., 1987; Davies et al., 1997, Hawkins and Davies, 2004) y aún después de cosechado el cultivo, las proteínas del sobrenadante pueden seguir sufriendo el fenómeno de oxidación debido a la presencia de compuestos oxidados y oxidantes, en los componentes del sobrenadante. Además, se ha reportado que la presencia de metales trazas en buffers y

excipientes añadidos a las soluciones también incrementan el daño oxidante (Miller et al., 1990; Krishnamurthy et al., 1995; Li et al., 1995; Buettner y Jurkiewicz, 1996; Kerwin, 2008; Wu et al., 2011; Maggio, 2012; Torosantucci et al., 2013).

Debido a esto, consideramos necesario medir los niveles de carbonilación presentes en las proteínas en las diferentes etapas de purificación. Para llevar a cabo este análisis, se realizaron cultivos de 250 mL de células High Five™ en dos medios diferentes: Express Five® y Excell 405®. Se decidió utilizar estos medios ya que como se mencionó en la sección 5.1. se observaron cambios en la calidad de la proteína producida (dato no mostrado). En medio Express Five se obtuvieron nanotubos de VP6 con longitud de más de 1 µm de longitud y de 45-70 nm de ancho, pero se obtuvieron rendimientos bajos (entre 10-20 mg/L de cultivo). En cambio, la producción en medio Excell 405® dio como producto final solamente agregados de la proteína. Nuestra hipótesis es que la oxidación afecta la producción de VP6_{NT} en medio ExCell 405®. Por ello, decidimos analizar las etapas de purificación de VP6.

Para analizar la producción en ambos medios se infectaron células como se describe en Materiales y Métodos y se cosecharon cuando ambos cultivos llegaron a una viabilidad celular del 50%. Antes y después de cada etapa de purificación se tomaron alícuotas de 2 mL separadas en viales de 1 mL cada una. Una de las muestras se almacenó a 4°C para su análisis por DLS, SDS-PAGE y Bradford, y a -20°C, para cuantificar los carbonilos (Headlam and Davies, 2004; Guedes et al., 2009). Las etapas de purificación de las que se tomaron alícuotas fueron las siguientes:

1. Centrifugación a 4,000 x g durante 10 minutos.
2. Ultrafiltración en equipo AMICON utilizando una membrana de 10,000 Da de corte.
3. Intercambio iónico (IEX).
4. Ultrafiltración en equipo AMICON utilizando una membrana de 10,000 Da de corte.
5. Cromatografía de exclusión molecular (SEC).
6. Ultrafiltración en equipo AMICON utilizando una membrana de 10,000 Da de corte.

En la tabla 4 se resumen los resultados del proceso de purificación de proteína VP6 en ambos medios de cultivo, incluyendo el volumen del cual se partió para cada etapa de purificación, la concentración de proteína total en cada etapa, la pureza de VP6 (determinada por densitometría de geles teñidos con azul de Coomassie, Figura 30) y la cantidad total de VP6 recuperada. En este trabajo solamente se muestra la purificación del sobrenadante de cultivo. Como se observa en la Figura 30, la mayor remoción de contaminantes ocurre en la etapa de intercambio iónico para ambos cultivos, lo cual concuerda con lo reportado por Plascencia-Villa et al. (2011). La producción en ambos medio de cultivo tuvieron productividades similares. La etapa inicial del proceso de purificación partió de 52.2 mg de VP6 para el medio Express Five® y de 54.4 mg de VP6 para el medio ExCell 405®. El valor de VP6 en cada etapa de purificación se determinó por medio de densitometría. El porcentaje de recuperación de proteína VP6 fue de 19.5% para Express Five® (con respecto a la VP6 inicial), lo que corresponde a 10.2 mg, mientras que para el cultivo en medio ExCell 405® fue de 15.6%, obteniéndose un total de 8.4 mg de VP6. Al final del proceso de purificación de la proteína en medio ExCell 405® solo se obtuvieron agregados de proteína (Figura 31B), mientras que en Express Five® se obtuvieron nanotubos de buena calidad.

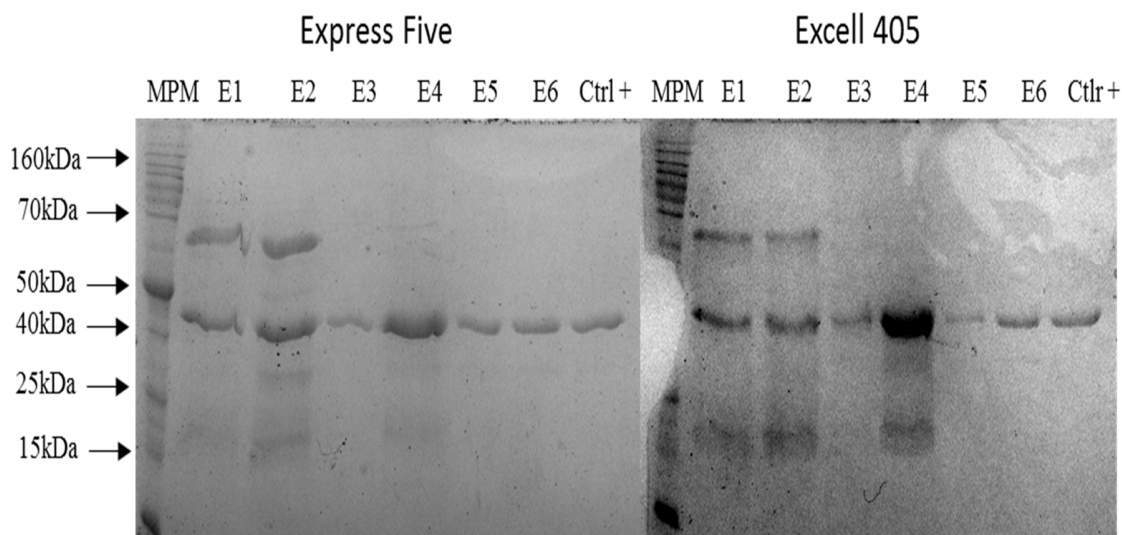


Figura 30. SDS-PAGE de las etapas de purificación de la proteína VP6 de rotavirus en medio Express Five® y ExCell® 405. Los geles fueron teñidos con azul de comassie. MPM: Marcador de peso molecular Benchmark, E1: centrifugación, E2: concentración sobrenadante, E3: Intercambio iónico, E4: Concentración pico 1

intercambio iónico, E5: Exclusión molecular, E6: Concentración pico 1 exclusión molecular y Ctrl+: VP6 a 0.5 mg/mL.

Tabla 4. Análisis de la purificación de VP6 en medio Express Five[®] y ExCell 405[®].

Express Five [®]					
	Volumen total, mL	Concentración proteína total, µg/mL	% Pureza VP6	VP6 total, µg	% VP6 recuperada
<i>Centrifugación</i>	240	568.9	38.2	52159.4	100.0
<i>Ultrafiltración</i>	160	850.5	37.5	51028.6	97.8
<i>IEX</i>	400	131.5	87.9	46231.2	88.6
<i>Ultrafiltración</i>	90	504.7	85.4	38791.4	74.4
<i>SEC</i>	200	70.5	>95	14109.5	27.1
<i>Ultrafiltración</i>	27	377.6	>95	10195.7	19.5
Excell 405 [®]					
	Volumen total, mL	Concentración proteína total, µg/mL	% Pureza VP6	VP6 total, µg	% VP6 recuperada
<i>Centrifugación</i>	240	494.5	45.9	54476.7	100.0
<i>Ultrafiltración</i>	180	665.4	44.3	53055.6	97.4
<i>IEX</i>	375	224.3	58.5	49215.7	90.3
<i>Ultrafiltración</i>	77.5	808.0	70.9	44396.3	81.5
<i>SEC</i>	340	27.0	>95	9192.5	16.9
<i>Ultrafiltración</i>	27	314.2	>95	8484.6	15.6

Posteriormente, se procedió a cuantificar la cantidad de carbonilos presentes en la proteína en las diferentes etapas de purificación como se describe en Materiales y Métodos (Figura 32). Como se puede observar en la Figura 32, la carbonilación en las diferentes etapas del proceso de purificación no varía, lo que nos indica que no existe un incremento en la oxidación y además, que la proteína VP6 no es más susceptible a oxidación que el resto de las proteínas del cultivo, ya que el enriquecimiento no resultó en un mayor contenido de carbonilos. En la etapa de permeación en gel para el caso de la producción en medio Express Five[®] se observó una disminución en la cantidad de carbonilos probablemente por la remoción de una gran cantidad de proteína no ensamblada en dicha etapa de purificación, lo que sugiere que esta etapa de proceso es muy importante para la remoción de proteína oxidada. Para el caso de la proteína producida en medio ExCell 405[®], el contenido de

carbonilos en la proteína siguió en valores altos aun después de la etapa de permeación en gel. El contenido de carbonilos fueron 60 ± 3 nmol C/ mg P en el sobrenadante de cultivo en medio Excell 405[®] y de 47 ± 4 nmol C/ mg P en Express Five[®]. El producto final de las etapas de purificación (después de la etapa de SEC) tuvo un contenido de carbonilos de 50 ± 18 nmol C/ mg P para el medio Excell 405[®] y de 3 ± 0.8 nmol C/ mg P para el medio Express Five[®]. Los contenidos de carbonilos observados durante las etapas de purificación están en el orden de carbonilación obtenida después de la MCO *in vitro* con 250-500 μ M de H₂O₂, ya obtenidos en este trabajo.

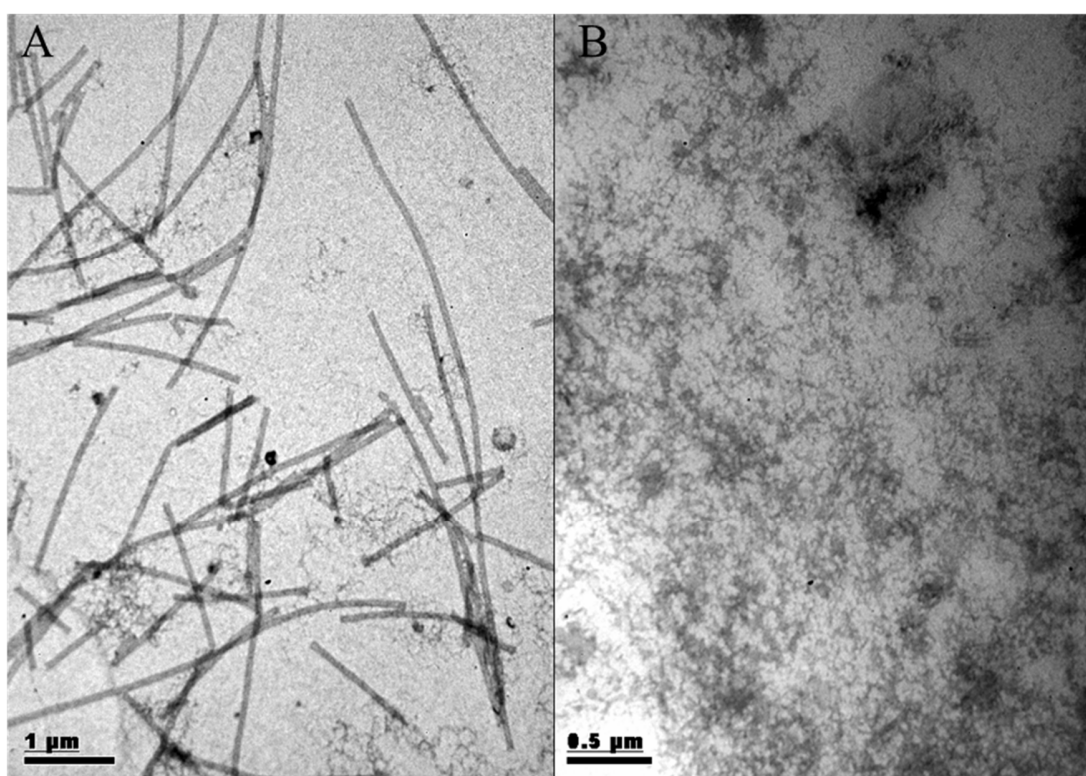


Figura 31. Micrografías electrónicas de transmisión de VP6 purificada en medio A) Express Five[®] y B) Excell 405[®]. Las micrografías fueron tomadas con una magnificación de 20,000 y 30,000X, respectivamente.

Dentro de los puntos que podemos resaltar de este experimento y que ya habíamos observado anteriormente, es que aunque hay una gran cantidad de proteína en el sobrenadante (más de 50 mg totales de VP6), el ensamblaje de la proteína VP6 en nanotubos parece no ser 100% eficiente. En trabajos anteriores por parte de nuestro grupo de investigación se han intentado implementar procesos de re-ensamblaje en la primera

etapa de purificación, sin obtener mejores rendimientos de nanotubos totales, lo que soporta nuestra hipótesis sobre la oxidación de la proteína y su disminución de la eficiencia de producción de nanotubos. En la sección 5.6, confirmamos con los experimentos *in vitro*, que la proteína desensamblada oxidada tiene una menor eficiencia de ensamblaje, lo que podría explicar por qué la proteína purificada del medio Excell 405® solo forme agregados. Considerando los niveles de carbonilación obtenidos en este trabajo, son pocos los estudios reportados en la literatura que miden el daño oxidante como carbonilación en proteínas de uso terapéutico. Uno de esos estudios midió la carbonilación de Interferon- γ (IFN- γ) al ser producida en cultivos de *E. coli* recombinante a diferentes tensiones de oxígeno disuelto y que resultó en un incremento en la carbonilación de la proteína, un incremento en la dimerización de la proteína y una pérdida de actividad de la misma al incrementarse la tensión de oxígeno disuelto (TOD) en los cultivos (Mohammadian-Mosaabadi et al., 2005). Los niveles reportados de carbonilos en dichos experimentos alcanzan una concentración de 0.5 nmol/mg de proteína a la concentración más alta de TOD (60% de saturación con aire). Al compararlo con los valores de carbonilación obtenidos en este trabajo, dichos valores se encuentran por debajo, lo que indicaría que la producción de proteína carbonilada en el sistema de células de insecto baculovirus es mayor o que VP6 es más susceptible que IFN- γ , o que las condiciones de oxidación eran distintas. Por otra parte, es necesario considerar lo ya reportado por Dalle-Donne y colaboradores (2003), quienes describen que las variaciones en los protocolos de cuantificación de carbonilos observados en diferentes trabajos, da como resultado variaciones en órdenes de magnitud de los niveles de carbonilación, incluso en trabajos realizados por un mismo grupo. Por ello, es necesario siempre utilizar una proteína estándar como BSA con la finalidad de comparar la cantidad de carbonilos producidos, la cual fue utilizada en este trabajo arrojando datos similares a los reportados en la literatura (Berlett et al., 1996).

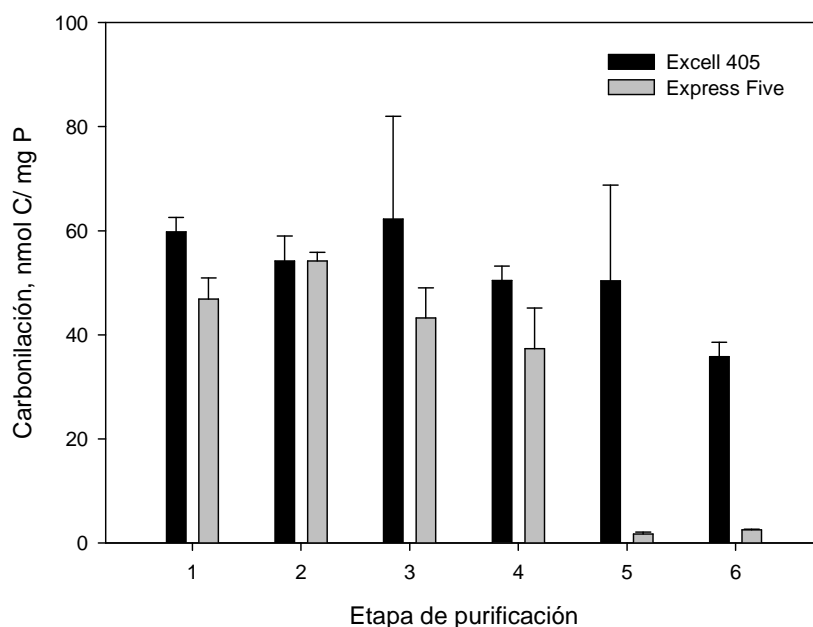


Figura 32. Carbonilación de proteína total en las diferentes etapas de purificación en los medios de cultivo Express Five[®] y Excell 405[®]. Las etapas de purificación son, 1: centrifugación, 2: ultrafiltración, 3: IEX, 4: ultrafiltración, 5: SEC, 6: ultrafiltración.

5.8.1. EVALUACIÓN DEL RE-ENSAMBLAJE Y CARBONILACIÓN DE LA PROTEÍNA VP6 PRESENTE EN EL PICO 2 DE PERMEACIÓN EN GEL

Por otra parte, como anteriormente se describió (ver tabla 4), gran parte de la VP6 producida no se encuentra ensamblada, sino en su forma trimérica o monomérica y por ende, eluye en el pico 4 en la etapa de permeación en gel que se muestra en la Figura 33B. Por ello decidimos analizar la carbonilación de la proteína en dicha muestra, así como si era posible el reensamblaje de VP6 presente en dicha muestra. Solamente se tomó la muestra proveniente de la producción en medio Express Five[®]. La proteína se concentró hasta obtener una concentración de 2 mg/mL por ultrafiltración en un equipo AMICON (Millipore, USA) con presión positiva a 5 psi con aire. El concentrado fue sometido a una etapa de desensamblaje adicionándole CaCl₂, esto para obtener un producto homogéneo con el cual proceder el re-ensamblaje. Se realizó un gel SDS-PAGE de la muestra de permeación en gel que se muestra en la Figura 33 (banda 3). Como se puede observar la proteína VP6 es mayoritaria y se encuentra por arriba del 80% en proporción con otros contaminantes.

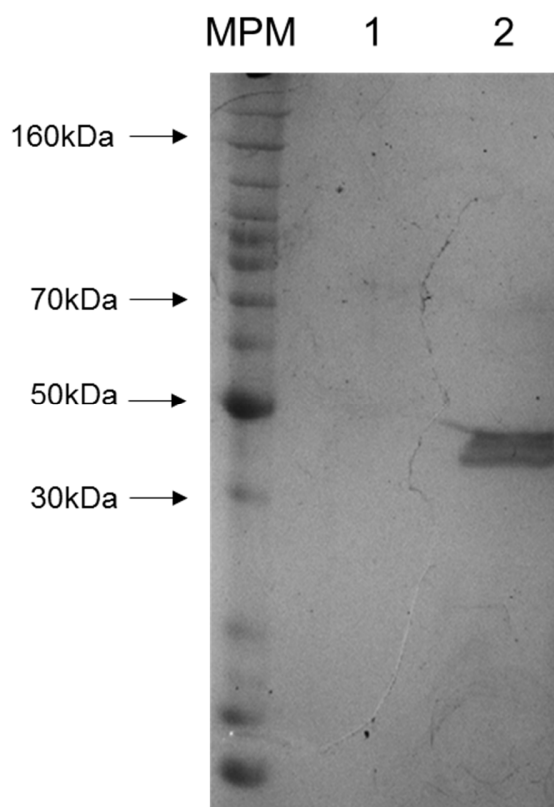


Figura 33. SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes de la proteína presente en los picos recolectados de SEC. MPM) Marcador de peso molecular Benchmark. 1) Pico 5 de SEC, como se esquematiza en la Figura 19B. 2) Pico 4 de SEC como se esquematiza en la Figura 19B. El gel se tiñó con azul de Coomassie.

Se midió la cantidad de carbonilos presentes en la muestra concentrada arrojando valores de 106 ± 27 nmolc/molp. Si consideramos que toda la proteína presente es VP6, los valores de carbonilación podrían ser expresados en molc/molp dando valores de 4.87 ± 1.25 molc/molp lo que es similar a lo obtenido en los experimentos *in vitro* utilizando una concentración de H_2O_2 de $1,000 \mu\text{M}$ en MCO. Cabe recalcar que bajo esa condición de oxidación, la eficiencia de ensamblaje de la proteína fue menor del 40%.

Se llevó a cabo el re-ensamblaje y las muestras se visualizaron al MET (Figura 34). Al observar las muestras re-ensambladas al MET solo se observaron agregados de gran tamaño, lo que nos indica que la proteína ha perdido la capacidad de ensamblarse y por ende, bajo las condiciones de producción en las cuales estamos trabajando no podríamos obtener mayores eficiencias en la producción de VP6_{NT}. Debido a esto, proponemos el uso de diferentes antioxidantes durante la infección con baculovirus para evitar de la manera

más eficientemente posible la oxidación de la proteína y alcanzar mayores rendimientos de proteína ensamblada en nanotubos.

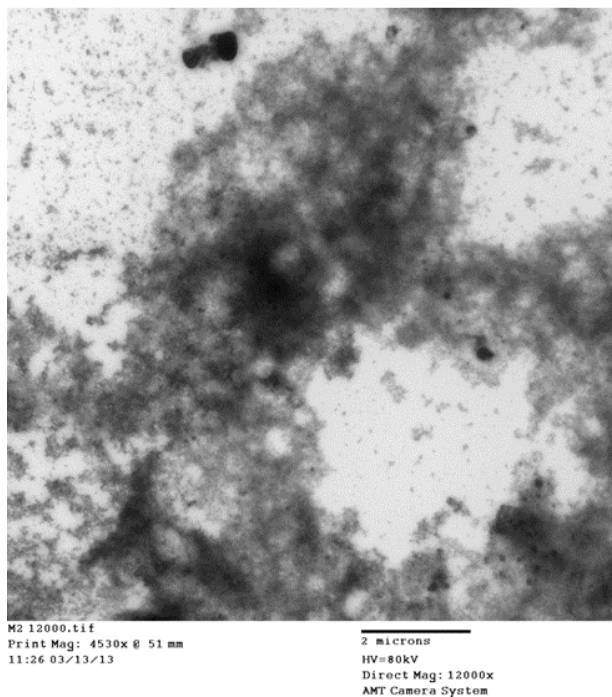


Figura 34. Micrografía electrónica de transmisión de la muestra del pico 2 de SEC sometida a re-ensamblaje. La micrografía muestra una amplificación de 12K.

Capítulo 6

Conclusiones

En este trabajo se describe por primera vez el efecto de las EROs sobre el ensamblaje de MPV. Encontramos que la oxidación de nanotubos de VP6 y VP6 desensamblada se produce de manera diferencial siendo más susceptible a la oxidación la proteína ensamblada.

Demostramos que la oxidación provoca modificaciones como carbonilación, agregación, cambio en el centro de masa espectral, que resultaron en una disminución de la capacidad de ensamblaje de VP6 en nanotubos. Por otra parte, comprobamos que la oxidación *in vitro* es una herramienta útil que nos permitirá entender y diseñar nuevos procesos en la producción de proteínas recombinante con fines terapéuticos.

Además, los resultados de este trabajo comprueban que es necesario minimizar el fenómeno de oxidación en todas las etapas del proceso de producción de MPV incluyendo la etapa de producción en cultivo, purificación y almacenaje.

Demostramos que el proceso de purificación *per se* no provoca un incremento en la oxidación de la proteína, sino que la proteína al final del proceso de producción contiene una gran cantidad de carbonilos que podrían ser responsables de los bajos rendimientos de VP6_{NT}.

Se implementó una metodología nueva y novedosa para el re-ensamblaje de VP6 que se basa en la precipitación del calcio por NaHCO₃ y que provee de material de muy buena calidad para sus posteriores aplicaciones.

Se demostró que bajo las condiciones de cultivo utilizadas en este trabajo requeríamos no fue posible seguir cinéticas de producción de EROs en cultivos sin infectar e infectados de células High Five[®] y Sf9. Sin embargo, si es posible hacer mediciones puntuales siempre y cuando, las células sean recientemente cargadas y no lleven etapas de incubación de más de 20 horas debido a los problemas que anteriormente describimos.

Capítulo 7

Perspectivas

Identificar a los aminoácidos que se oxidan tanto en nanotubos como en VP6 desensamblada para explicar y entender los fenómenos que se observaron en este trabajo.

Determinar el efecto de la oxidación en la proteína VP6 en el ensamblaje de estructuras icosaédricas (esferas).

Una vez identificados los residuos oxidables en VP6, llevar a cabo mutaciones puntuales sobre aquellos sitios oxidables ricos en residuos RPKT que no afecten su ensamblaje en nanotubos y que permitan una mayor protección a la oxidación.

Realizar cultivos de células de insecto tanto en matraz como en bioreactor controlado adicionando diferentes antioxidantes para obtener la mayor cantidad de proteína ensamblada en nanotubos de VP6.

Capítulo 8

Contribuciones

Este es el primer estudio en donde se analiza el efecto de la oxidación en el ensamblaje de proteínas virales.

Se propuso una manera de evaluar la susceptibilidad a la oxidación de proteínas.

Al entender cómo la oxidación afecta la producción y ensamblaje de macroestructuras virales podremos diseñar estrategias racionales con las cuales mejorar la productividad de los procesos actuales y obtener una mayor eficiencia.

Se implementó la cuantificación de carbonilos como una medida de calidad en la proteína que puede ser utilizada para monitorear bioprocesos: producción, purificación y procesamiento.

Artículos:

Castro-Acosta, RM, Rodríguez-Limas, WA., Valderrama, B., Ramírez, OT., Palomares, LA. (2014). Effect of metal catalyzed oxidation in recombinant viral protein assemblies. *Microbial Cell Factories*,13(1): 25. **ANEXOS**

Plascencia-Villa G, Mena JA, **Castro-Acosta RM**, Fabián JC, Ramírez OT, Palomares LA (2011) Strategies for the purification and characterization of protein scaffolds for the production of hybrid nanobiomaterials. *J Chromat B*. 879: 1105-1111. **ANEXOS**

Rodriguez M, Wood C, Sánchez-López R, **Castro-Acosta RM**, Ramírez OT, Palomares LA (2014). Understanding internalization of rotavirus VP6 nanotubes by cells: towards a recombinant vaccine. *Archives of Virology*.159(5): 1005-1015. **ANEXOS**

Mena JA, **Castro-Acosta RM**, Ramírez OT, Palomares LA. Assembly kinetics of rotavirus VP6: From nanotubes to icosahedral structures. En preparación.

Rodríguez M, **Castro-Acosta RM**, Ramírez OT, Palomares LA. New method for the assembly of recombinant viral proteins: Constructing VP6 nanotubes. En preparación.

Capítulo 9

Referencias

- Aranda A., Sequedo L., Tolosa L., Quintas G., Burello E., Castell J.V., Gombau L. (2013). Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: A quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells. *Toxicology in Vitro*. 27(2), 954-963.
- Auer S., Dobson C.M., Vendruscolo M. (2007). Characterization of the nucleation barriers for protein aggregation and amyloid formation. *HFSP J.* 1:137–146.
- Ausar S.F., Foubert T.R., Hudson M.H., Vedvick T.S., Middaugh C.R. (2006). Conformational stability and disassembly of Norwalk virus-like particles effect of pH and temperature. *Journal of Biological Chemistry*, 281(28). 19478-19488.
- Barelli S., Canellini G., Thadikkaran L., Crettaz D., Quadroni M., Rossier J.S., Tissot J., Lion N. (2008) Oxidation of proteins: Basic principles and perspectives for blood proteomics. *Proteomics Clin. Appl.* 2(2): 142-157.
- Baron C.P., Refsgaard H.H., Skibsted L.H., Andersen M.L. (2006). Oxidation of bovine serum albumin initiated by the Fenton reaction-effect of EDTA, tert-butylhydroperoxide and tetrahydrofuran. *Free Radic Res.* 40:409–417.
- Berger I., Fitzgerald D.J., Richmond T.J. (2004). Baculovirus expression system for heterologous multiprotein complexes. *Nature Biotechnology*. 22(12): 1583-1587.
- Berlett B.S., Levine R.L., Stadtman E.R. (1996). Comparison of the effects of ozone on the modification of amino acid residues in glutamine synthetase and bovine serum albumin. *J. Biol. Chem.* 271(8): 4177-4182.

-
- Blazevic V., Lappalainen S., Nurminen K., Huhti L., Vesikari T. (2011). Norovirus VLPs and rotavirus VP6 protein as combined vaccine for childhood gastroenteritis. *Vaccine*. 29:8126–8133.
- Blutt S.E., Warfield K.L., O’Neil C.M., Estes M.K., Conner M.E. (2005). Host, viral, and vaccine factors that determine protective efficacy induced by rotavirus and virus-like particles (VLPs). *Vaccine*. 24(8):1170-1179.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254
- Boisgérault F., Morón G., Leclerc C. (2002). Virus-like particles: a new family of delivery systems. *Expert Review of Vaccines*. 1(1): 101-109.
- Bounty S., Rodriguez R., Linden K.G. (2012). Inactivation of Adenovirus Using Low-Dose UV/H₂O₂ Advanced Oxidation. *Water Res*. 46:6273–6278.
- Bourdon E., Blache D. (2001). The importance of proteins in defense against oxidation. *Antioxidants and Redox Signaling*. 3(2): 293-311.
- Buettner G.R., Jurkiewicz B.A. (1996). Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiation research*. 145(5), 532-541.
- Buonocore G., Perrone S., Tataranno M.L. (2010). Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. In *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. 15(4): 186-190).
- Burns J.M., Cooper W.J., Ferry J.L., King D.W., DiMento B.P., McNeill K., Waite, T.D. (2012). Methods for reactive oxygen species (ROS) detection in aqueous environments. *Aquatic sciences*. 74(4), 683-734.
- Carreño-Fuentes L., Ascencio J.A., Medina A., Aguila S., Palomares L.A., Ramírez O.T. (2013). Strategies for specifically directing metal functionalization of protein nanotubes: constructing protein coated silver nanowires. *Nanotechnology*. 24:235602.

- Castro-Acosta R.M., Rodríguez-Limas W.A., Valderrama B., Ramírez O.T., Palomares L.A. (2014). Effect of metal catalyzed oxidation in recombinant viral protein assemblies. *Microbial cell factories*. 13(1): 25.
- Ceres P., Zlotnick A. (2002). Weak protein-protein interactions are sufficient to drive assembly of hepatitis B virus capsids. *Biochemistry*. 41(39): 11525-11531.
- Chackerian B., Schiller J.T. (2012). Virus-Like Particles as Antigen Scaffolds. *Vaccinology: Principles and Practice*: 196-208.
- Crawford S.E., Labbe M., Cohen J., Burroughs M.H., Zhou Y., Estes M. (1994). Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *Journal of Virology*. 68(9): 5945-5952.
- Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Milzani A., Colombo R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*. 329:23–38.
- Davies K.J.A., Delsignore M.E., Lin S.W. (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. *J Biol Chem*. 262(20): 9902-9907.
- Davies M.J., Dean R.T., Davies M.J., Davies D. (1997). Radical-mediated protein oxidation: from chemistry to medicine. *Oxford: Oxford University Press*. pp. 1-443.
- Desikan R., Mackerness S.A.H., Hancock J.T., Neill S.J. (2001). Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiology* 127:159–172.
- Dikalov S.I., Harrison D.G. (2014). Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species. *Antioxidants & redox signaling*. 20(2), 372-382.
- Ding Y., Chuan Y. P., He L., Middelberg A.P. (2010). Modeling the competition between aggregation and self-assembly during virus-like particle processing. *Biotechnology and bioengineering*. 107(3), 550-560.
- Dormitzer P.R., Nason E.B., Prasad B.V.V., Harrison S.C. (2004). Structural rearrangements in the penetration membrane protein of a non-enveloped virus. *Nature*. 430(7003): 1053-1058.

- Doverskog M., Han L., Häggström L. (1998). Cystine/cysteine metabolism in cultured Sf9 cells: influence of cell physiology on biosynthesis, amino acid uptake and growth. *Cytotechnology*. 26(2), 91-102.
- Drews M., Doverskog M., Öhman L., Chapman B. E., Jacobsson U., Kuchel P.W., Häggström L. (2000). Pathways of glutamine metabolism in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) insect cells: evidence for the presence of the nitrogen assimilation system, and a metabolic switch by $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ NMR. *Journal of biotechnology*. 78(1), 23-37.
- Edward A.M.M., Silva E.S. (1986). Exposure of tryptophanyl residues in α -lactalbumin and lysozyme. *Radiat Environ Biophys*. 25: 113-122.
- Estes M.K., Cohen J. (1989). Rotavirus gene structure and function. *Microbiological Reviews*. 53(4): 410-449.
- Fedorova M., Bollineni R.C., Hoffmann R. (2013). Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. *Mass Spectrom Rev*. 33:79-97.
- Fischer W.W. (2014). Oxygen-A Four Billion Year History. *Science*. 343(6173), 840-840.
- Fu P.P., Xia Q., Hwang H.M., Ray P.C., Yu H. (2014). Mechanisms of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species. *Journal of Food and Drug Analysis*. 22(1): 64-75.
- Garrison W.M. (1987). Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chem Rev*. 87:381-398.
- Gilbert J.M., Feng N., Patton J.T., Greenberg H.B. (2001). Rotavirus assembly-interaction of surface protein VP7 with middle layer protein VP6. *Archives in Virology*. 146(6): 1155-1171.
- Giulivi C., Davies K.J. (1994). Dityrosine: a marker for oxidatively modified proteins and selective proteolysis. *Methods in enzymology*. 233: 363.
- Glass R.I., Parashar U., Patel M., Gentsch J., Jiang B. (2014). Rotavirus vaccines: Successes and challenges. *Journal of Infection*. 68: S9-S18.

-
- Goetz M.E., Luch A. (2008). Reactive species: a cell damaging route assisting to chemical carcinogens. *Cancer Lett.* 266:73–83.
- Guedes S., Vitorino R., Domingues R., Amado F., Domingues P. (2009) Oxidation of bovine serum albumin: identification of oxidation products and structural modifications. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 23(15): 2307-2315.
- Gülden M., Jess A., Kammann J., Maser E., Seibert H. (2010). Cytotoxic potency of H₂O₂ in cell culture: Impact of cell concentration and exposure time. *Free Radic Bio Med.* 49: 1298-1305.
- Hambarde, S., Singh, V., Chandna, S. (2013). Evidence for involvement of cytosolic thioredoxin peroxidase in the excessive resistance of Sf9 Lepidopteran insect cells against radiation-induced apoptosis. *PloS one*, 8(3), e58261.
- Hawe A., Wiggenhorn M., Van der Weert M., Garbe J.H.O., Mahler H., Jiskoot W. (2012) Forced Degradation of Therapeutic Proteins. *J Pharm Sci.* 101(3): 895-913.
- Headlam H.A., Davies M.J. (2004). Markers of protein oxidation: different oxidants give rise to variable yields of bound and released carbonyl products. *Free Radic Bio Med.* 36:1175–1184.
- Hirst J., King M.S., Pryde K.R. (2008). The production of reactive oxygen species by complex 1. *Biochemical Society Transactions.* 36(5): 976-980.
- Hu D., Qin Z., Xue B., Fink A.L., Uversky V.N. (2008). Effect of methionine oxidation on the structural properties, conformational stability, and aggregation of immunoglobulin light chain LEN. *Biochemistry.* 47:8665–8677.
- Isa P., Gutiérrez M., Arias C.R., López S. (2008). Rotavirus cell entry. *Future Virology.* 3(2): 135-146.
- Jarvis D.L., García A. Jr. (1994). Biosynthesis and processing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus gp64 protein. *Virology.* 205: 300-313.

- Jeong J., Jung Y., Na S., Jeong J., Lee E., Kim M.S., Choi S., Shin D.H., Paek E., Lee H.Y. (2011). Novel oxidative modifications in redox-active cysteine residues. *Mol Cell Proteomics*. 10.
- Kalyanaraman B., Darley-Usmar V., Davies K.J., Dennery P.A., Forman H.J., Grisham M.B., Ischiropoulos H. (2012). Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radical Biology and Medicine*. 52(1), 1-6.
- Kapikian A.Z., Hoshino Y. (2007). To serotype or not serotype: That is still the question. *The Journal of Infectious Diseases*. 195: 611-614.
- Kerwin B.A. (2008). Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: structure and degradation pathways. *Journal of pharmaceutical sciences*. 97(8), 2924-2935.
- Kost T.A., Condreay J.P., Jarvis D.L. (2005). Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology*. 23(5): 567-575.
- Krishnamurthy R., Madurawe R.D., Bush K.D., Lumpkin J.A. (1995). Conditions promoting metal-catalyzed oxidations during immobilized Cu-iminodiacetic acid metal affinity chromatography. *Biotechnology progress*. 11(6), 643-650.
- LaBarre D.D., Lowy R.J. (2001). Improvements in methods for calculating virus titer estimates from TCID₅₀ and plaque assays. *Journal of virological methods*. 96(2), 107-126.
- Lakowicz J.R. (2009). *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer, New York.
- Lassoued S., Ameer R.B., Ayadi W., Gargouri B., Mansour R.B., Attia H. (2008). Epstein-Barr virus induces an oxidative stress during the early stages of infection in B lymphocytes, epithelial, and lymphoblastoid cell lines. *Molecular and cellular biochemistry*. 313(1-2), 179-186.
- Lawton J.A., Zeng C.Q., Mukherjee S.K., Cohen J., Estes M.K., Prasad B.V.V. (1997). Three-dimensional structure analysis of recombinant rotavirus-like particles with intact and amino-terminal deleted VP2: Implications for the architecture of the VP2 capsid layer. *Journal of Virology*. 71(10): 7353-7360.

- Lenz P., Thompson C.D., Day P.M., Bacot S.M., Lowy D.R., Schiller J.T. (2003). Interaction of papillomavirus virus-like particles with human myeloid antigen-presenting cells. *Clinical Immunology*. 106(3): 231-237.
- Lepault J., Petitpas I., Erk I., Navaza J., Bigot D., Dona M., Vachette P., Cohen J., Rey F.A. (2001). Structural polymorphism of the major capsid protein of rotavirus. *EMBO Journal*. 20(7): 1498-1507.
- Levine R.L., Williams J.A., Stadtman E.R., Shacter E. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology*. 233: 346-357.
- Levine R.L., Berlett B.S., Moskovitz J., Mosoni L., Stadtman E.R. (1999). Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. Mechanisms of Ageing and Development. 107: 323-332.
- Li Q., Harvey L.M., McNeil B. (2008) Oxygen enrichment: effects on protein oxidation, proteolytic activity and the energy status of submerger batch cultures of *Aspergillus niger* B1-D. *Proc Biochem*. 43: 238-243.
- Li S., Schöneich C., Borchardt R.T. (1995). Chemical instability of protein pharmaceuticals: Mechanism of oxidation and strategies for stabilization. *Biotechnol Bioeng*. 48: 490-500.
- Liu D., Ren D., Huang H., Dankberg J., Rosenfeld R., Cocco M.J., Li L., Brems D.N., Remmele R.L. (2008). Structure and stability changes of human IgG1 Fc as a consequence of methionine oxidation. *Biochemistry*. 47:5088–5100.
- Maggio E.T. (2012). Polysorbates, peroxides, protein aggregation, and immunogenicity-a growing concern. *Journal of Excipients & Food Chemicals*, 3(2).
- Mahler H.C., Friess W., Grauschopf U., Kiese S. (2009). Protein aggregation: pathways, induction factors and analysis. *J Pharm Sci*. 98:2909–2934.
- Maisonneuve E., Ducret A., Khoueiry P., Lignon S., Talla E., Dukan S. (2009). Rules governing selective protein carbonylation. *PLOS one*. 4(10): e7269.

- Mathieu M., Petitpas I., Navaza J., Lepault J., Kohli E., Pothier P., Prasad B.V.V., Cohen J., Rey F.A. (2001). Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus implications for the architecture of the virion. *EMBO Journal*. 20(7): 1485-1497.
- Matthijnssens J., Ciarlet M., McDonald S.M., Attoui H., Banyai K., Brister J.R., Buesa J., Esona M.T., Estes M.K., Gentsch J.R., Iturriza-Gómara M., Johne R., Kirkwood C.D., Martella V., Mertens P.P.C., Nakagomi O., Parreño V., Rahman M., Ruggeri F.M., Saif L.J., Santos N., Steyer A., Taniguchi K., Patton J.T., Van Ranst M. (2011). Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol*. 156(8):1397–413.
- Markovic I., Pulyaeva H., Sokoloff A., Chernomordik L.V. (1998). Membrane fusion mediated by baculovirus gp64 involves assembly of stable gp64 trimers into multiprotein aggregates. *Journal of Cell Biology*. 143(5): 1155-1166.
- Mena J.A., Ramírez O.T., Palomares L.A. (2003). Titration of non-included baculovirus using a cell viability assay. *Biotechniques*. 34(2): 260-264.
- Mena J.A., Ramírez O.T., Palomares L.A. (2005). Quantification of rotavirus-like particles by gel permeation chromatography. *Journal of Chromatography B*. 824(1-2): 267-276.
- Mena J.A., Ramírez O.T., Palomares L.A. (2006). Intracellular distribution of rotavirus structural proteins and virus-like particles expressed in the insect cell-baculovirus system. *Journal of Biotechnology*. 122: 443-452.
- Mena J.A. (2007). Desarrollo de estrategias racionales de producción de pseudo partículas virales en el sistema de células de insecto baculovirus. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mena J.A., Aucoin M.G., Montes J., Chahal P.S., Kamen A.A. (2010). Improving adeno-associated vector yield in high density insect cell cultures. *The journal of gene medicine*. 12(2), 157-167.
- Mena J.A., Castro-Acosta R.M., Ramírez O.T., Palomares L.A. Assembly kinetics of rotavirus VP6: From nanotubes to icosahedral structures. *En preparación*.

- Meucci E., Mordente A., Martorana G. (1991) Metal-catalyzed oxidation of human serum albumin: Conformational and functional changes. *J Biol Chem.* 266(8): 4692-4699.
- Meunier S., Strable E., Finn M. (2004). Crosslinking of and coupling to viral capsid proteins by tyrosine oxidation. *Chem Biol.* 11:319–326.
- Miller D.M., Buettner G.R., Aust S.D. (1990). Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. *Free Radical Biology and Medicine.* 8(1), 95-108.
- Mohana-Borges R., Silva J.L., de Prat-Gay G. (1999). Protein folding in the absence of chemical denaturants. Reversible pressure denaturation of the noncovalent complex formed by the association of two protein fragments. *J Biol Chem.* 274:7732–7740.
- Mohammadian-Mosaabadi J., Naderi-Manesh H., Maghsoudi N., Khalilzadeh R., Shojaosadati S.A., Ebrahimi M. (2005). Effect of oxidative stress on the production of recombinant human interferon- γ in *Escherichia coli*. *Biotechnology and applied biochemistry.* 41(1), 37-42.
- Møller I.M., Rogowska-Wrzesinska A., Rao R.S.P. (2011). Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective. *Journal of proteomics.* 74(11), 2228-2242.
- Mukherjee S., Thorsteinsson M.V., Johnston L.B., DePhillips P.A., Zlotnick A. (2008). A quantitative description of in vitro assembly of human papillomavirus 16 virus-like particles. *Journal of molecular biology.* 381(1), 229-237.
- Mulinacci F., Capelle M.A.H., Gurny R., Drake A.F., Arvinte T. (2011). Stability of human growth hormone: influence of methionine oxidation on thermal folding. *J Pharm Sci.* 100:451–463.
- Noad R., Roy P. (2003). Virus-like particles as immunogens. *TRENDS in Microbiology.* 11(9): 438-444
- Noad R., Roy P. (2013). Virus-like Particles. *Bionanotechnology: Biological Self-assembly and Its Applications.* 167.

- Ogata N. (2012). Inactivation of influenza virus haemagglutinin by chlorine dioxide: oxidation of the conserved tryptophan 153 residue in the receptor-binding site. *J Gen Virol.* 93:2558–2563.
- O'Really D., Miller L., Luckow V.A. (1994). Baculovirus expression vector: a laboratory manual. Ed. *Oxford University Press*. New York. pp. 27-30.
- Ottaviano F.G., Handy D.E., Loscalzo J. (2008) Redox regulation in the extracellular environmental. *Official Journal of the Japanese Circulation Society.* 72: 1-16.
- Palomares L.A., López S., Ramírez O.T. (2004) Utilization of oxygen uptake rate to assess the role of glucose and glutamine in the metabolism of infected cell cultures. *Biochem Eng J.* 19: 87-93.
- Palomares L.A., Estrada-Mondaca S., Ramírez O.T. (2006). Principles and applications of the insect-cell-baculovirus expression vector system, In: Ozturk S.S., Hu W.S. (Eds.), *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cellular Applications*. Taylor and Francis, Nueva York. pp. 627-692.
- Palomares L.A., Ramírez O.T. (2009) Challenges for the production of virus-like particles in insect cells: The case of rotavirus-like particles. *Biochem Eng J.* 45:158-167.
- Palomares L.A., Mena J.A., Ramírez O.T. (2012). Simultaneous expression of recombinant proteins in the insect cell-baculovirus system: Production of virus-like particles. *Methods*, 56(3), 389-395.
- Pastor A.R., Rodríguez-Limas W.A., Contreras M.A., Esquivel E., Esquivel-Guadarrama F., Ramírez O.T., Palomares L.A. (2014). The assembly conformation of rotavirus VP6 determines its protective efficacy against rotavirus challenge in mice. *Vaccine*.
- Pattenden L.K., Middelberg A.P.J., Niebert M., Lipin D.L. (2005). Towards the preparative and large-scale precision manufacture of virus-like particles. *Trends in Biotechnology.* 23(10): 523-529.
- Patton J.T., Spencer E. (2000). Genome replication and packaging of segmented double stranded RNA viruses. *Virology.* 277(2): 217-225.

-
- Perez-Vargas J., Isa P., López S., Arias C.F. (2006). Rotavirus vaccine: Early introduction in latin american-risk and benefits. *Archives in Medical Research*. 37(1): 1-10.
- Phelps D.K., Speelman B., Post B.C. (2000). Theoretical studies of viral capsid proteins. *Current Opinion in Structural Biology*. 10: 170-173.
- Plascencia-Villa G., Saniger J.M., Ascencio J.A., Palomares L.A., Ramírez O.T. (2009) Use of recombinant rotavirus VP6 nanotubes as a multifunctional template for the synthesis of nanobiomaterials functionalized with metals. *Biotechnol Bioeng*. 104 (5): 871-881.
- Plascencia-Villa G., Mena J.A., Castro-Acosta R.M., Fabián J.C., Ramírez O.T., Palomares L.A. (2011) Strategies for the purification and characterization of protein scaffolds for the production of hybrid nanobiomaterials. *Journal of Chromatography B*. 879: 1105-1111.
- Plascencia-Villa G., Medina A., Palomares L. A., Ramirez O. T., Ascencio J.A. (2013). Structural Characterization of Rotavirus-Directed Synthesis and Assembly of Metallic Nanoparticle Arrays. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 13(8), 5572-5579.
- Prasad B.V.V., Burns J.W., Marietta E., Estes M.K., Chiu W. (1990). Localization of VP4 neutralization sites in rotavirus by three-dimensional cryo-electron microscopy. *Nature*. 343(6257): 476-479.
- Rastogi R.P., Singh S.P., Incharoensakdi A., Häder D.P., Sinha R.P. (2014). Ultraviolet radiation-induced generation of reactive oxygen species, DNA damage and induction of UV-absorbing compounds in the cyanobacterium *Rivularia* sp. HKAR-4. *South African Journal of Botany*, 90:163-169.
- Refsgaard H.H.F., Tsai L., Stadtman E.R. (2000). Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products. *PNAS*. 97(2): 611-616.
- Reudl C., Storni T., Lechner F., Bachi T., Bachmann M.F. (2002). Cross-presentation of virus-like particles by skin-derived CD8(-) dendritic cells: a dispensable role for TAP. *European Journal of Immunology*. 32(3): 818-825.

-
- Rios De Anda, B.I. (2012). Estudio de las propiedades mecánicas y polimorfismo de VP6 de Rotavirus mediante ultrasonificación. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rivas-Pedraza M.A. (2013). Evaluación de medios de cultivo para la producción de una vacuna recombinante contra Rotavirus. Tesis de Licenciatura. Universidad Politécnica del Estado de Morelos.
- Roche M., Rondeau P., Singh N.R., Tarnus E., Bourdon E. (2008). The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Letters*. 582: 1783-1787.
- Rodríguez-Limas W.A., Sekar K., Tyo K.E. (2013). Virus-like particles: the future of microbial factories and cell-free systems as platforms for vaccine development. *Curr Opin Biotechnol*. 24:1089–1093.
- Rodríguez M., Wood, C., Sanchez-López R., Castro-Acosta R.M., Ramírez O.T., Palomares L.A. (2013). Understanding internalization of rotavirus VP6 nanotubes by cells: towards a recombinant vaccine. *Archives of virology*. 1-11.
- Rodríguez M, Castro-Acosta R.M., Ramírez O.T., Palomares L.A. New method for the assembly of recombinant viral proteins: Constructing VP6 nanotubes. *En preparación*.
- Roy P., Mikhailov M., Bishop D.H.L. (1997). Baculovirus multigene expression vectors and their use for understanding the assembly process of architecturally complex virus particles. *Gene*. 190(1): 119-129.
- Ruiz M.C., Charpilienne A., Liprandi F., Gajardo R., Michelangeli F., Cohen J. (1996). The concentration of Ca^{+2} that solubilizes outer capsid proteins from rotavirus particles is dependent on the strain. *Journal of Virology*. 70(8): 4877-4883.
- Rule W.K, Menin L., Montoya J.P., Kohn T. (2010). Oxidation of virus proteins during UV₂₅₄ and singlet oxygen mediated inactivation. *Environ Sci Technol*. 44:5437–5443.
- Sabara M., Parker M., Aha P., Cosco C., Gibbons E., Parsons S., Babiuk L. (1991). Assembly of double-shelled rotavirus like particles by simultaneous expression of recombinant VP6 and VP7 proteins. *Journal of Virology*. 65(12): 6994-6997.

-
- Sano D., Pintó R.M., Omura T., Bosch A. (2010) Detection of oxidative damages on viral capsid proteins for evaluating structural integrity and infectivity of human norovirus. *Environ. Sci. Technol.* 44(2): 808-812.
- Schafer F.Q., Buettner G.R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine.* 30(11), 1191-1212.
- Schulz E., Wenzel P., Münzel T., Daiber A. (2014). Mitochondrial redox signaling: interaction of mitochondrial reactive oxygen species with other sources of oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling.* 20(2): 308-324.
- Simat T., Steinhart H. (1998). Oxidation of free tryptophan and tryptophan residues in peptides and proteins. *J Agr Food Chem.* 46:490–498.
- Singh S.K. (2011) Impact of product-related factors on immunogenicity of biotherapeutics. *J Pharm Sci.* 100: 354-387.
- Stadtman E.R., Levine R.L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino acids.* 25(3-4), 207-218.
- Tleugabulova D., Falcón V., Pentón E., Sewer M., Fleitas Y. (1999) Aggregation of recombinant hepatitis B surface antigen induced in vitro by oxidative stress. *J Chromat B.* 736(1-2): 153-166.
- Trask S.D., Dormitzer P.R. (2006). Assembly of highly infectious rotavirus particles recoated with recombinant outer capsid proteins. *Journal of Virology.* 80(22): 11923-11304.
- Torosantucci R., Schöneich C., Jiskoot W. (2013). Oxidation of therapeutic proteins and peptides: structural and biological consequences. *Pharm Res.* 1–13.
- Turrens J.F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 552(2): 335-344.
- Vieira H.L.A., Pereira A.C.P., Carrondo M.J.T., Alves P.M. (2006) Catalase effect on cell death for the improvement of recombinant protein production in baculovirus-insect cell system. *Bioprocess Biosyst Eng.* 29:409-414.

-
- Vivian J.T., Callis P.R. (2001). Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophys J.* 80:2093-2109.
- Wang Y., Oberley L.W., Murhammer D.W. (2001). Antioxidant defense systems of two lepidopteran insect cell lines. *Free Radical Biology and Medicine.* 30(11), 1254-1262.
- Wang Y., Oberley L.W., Murhammer D.W. (2001) Evidence of oxidative stress following the viral infection of two lepidopteran insect cell lines. *Free Radical Biology and Medicine.* 31(11): 1448-1455.
- Wu Y., Levons J., Narang A.S., Raghavan K., Rao, V.M. (2011). Reactive impurities in excipients: profiling, identification and mitigation of drug–excipient incompatibility. *AAPS PharmSciTech.* 12(4), 1248-1263.
- Ye L., Lin Y., Bennouna S., Lo M., Wu Q., Bu Z., Pulendran B., Compans R., Yang C. (2006). Ebola virus-like particles produced in insect cells exhibit dendritic cell stimulating activity and induce neutralizing antibodies. *Virology.* 1 (351): 260-270.
- Yeager M., Berriman J.A., Baker T.S., Bellamy A.R. (1994). Three-dimensional structure of the rotavirus haemagglutinin VP4 by cryo-electron microscopy and difference map analysis. *EMBO Journal.* 13(5): 1011-1018.
- Zeng C.Q., Estes M.K., Chapilienne A., Cohen J (1989). The N-Terminus of rotavirus VP2 is necessary for encapsidation of VP1 and VP3. *Journal of Virology.* 72(1): 201-208.
- Zlotnick A. (2003). Are weak protein- protein interactions the general rule in capsid assembly?. *Virology.* 315(2): 269-274.

Anexos

A1. DIFERENCIA EN LA EFICIENCIA CUÁNTICA DEL PRODUCTO DESENSAMBLADO Y NANOTUBOS DE VP6

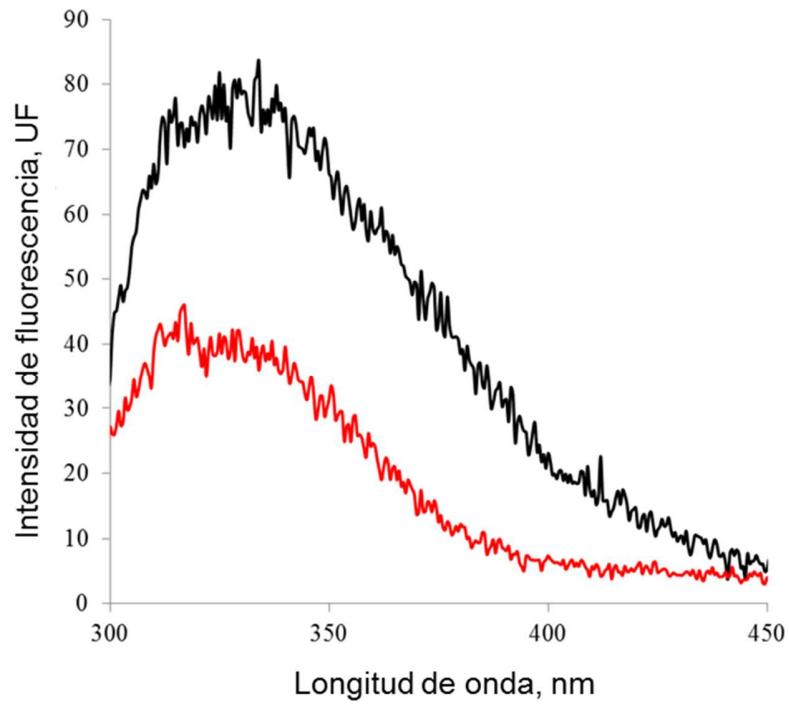


Figura A1. Espectro de fluorescencia de Trp de nanotubos y proteína desensamblada. En línea roja se observa la VP6_{NT} y en línea negra la VP6_U. Se excitó a una longitud de onda de 295 nm y se midió la fluorescencia desde 300 nm hasta 600 nm.

A2. GELES DESNATURALIZANTES SDS-PAGE DE PROTEÍNA OXIDADA

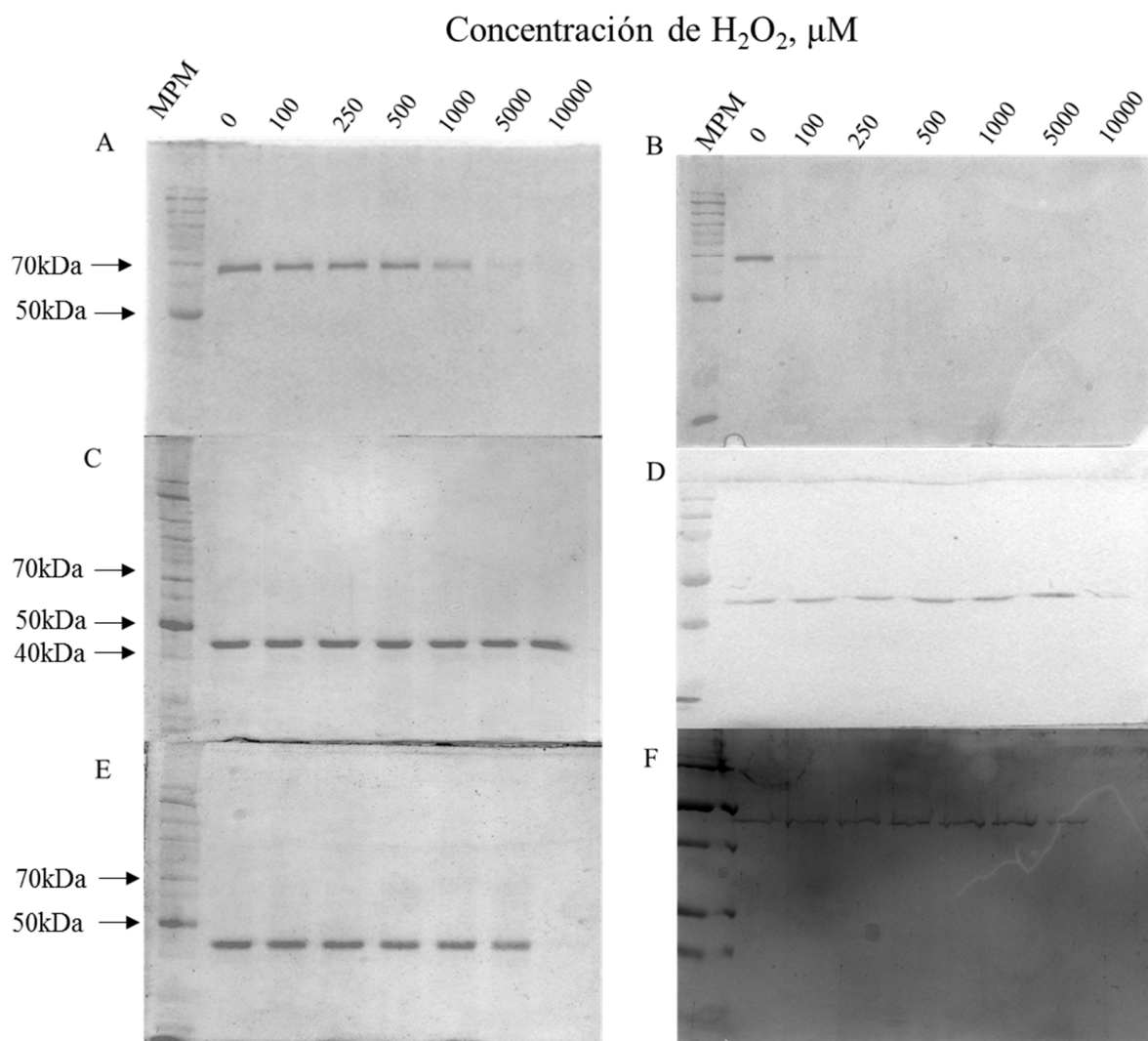


Figura A2. Geles desnaturizantes de proteína oxidada por MCO. A) Oxidación de BSA durante 1 hora de incubación. B) Oxidación de BSA durante 6 horas de incubación. C) Oxidación de nanotubos de VP6 durante 1 hora de incubación. D) Oxidación de nanotubos de VP6 durante 6 horas de incubación. E) Oxidación de VP6 desensamblada durante 1 hora de incubación. F) Oxidación de VP6 desensamblada durante 6 horas de incubación. La oxidación se llevó a cabo realizando la MCO a diferentes concentraciones de H₂O₂, como se indica en la parte superior de la figura. Se utilizó marcador de peso molecular Benchmark (Lifetechnologies, USA).

A3. ESPECTROS DE FLUORESCENCIA DE PROTEÍNA VP6_U OXIDADA CON H₂O₂

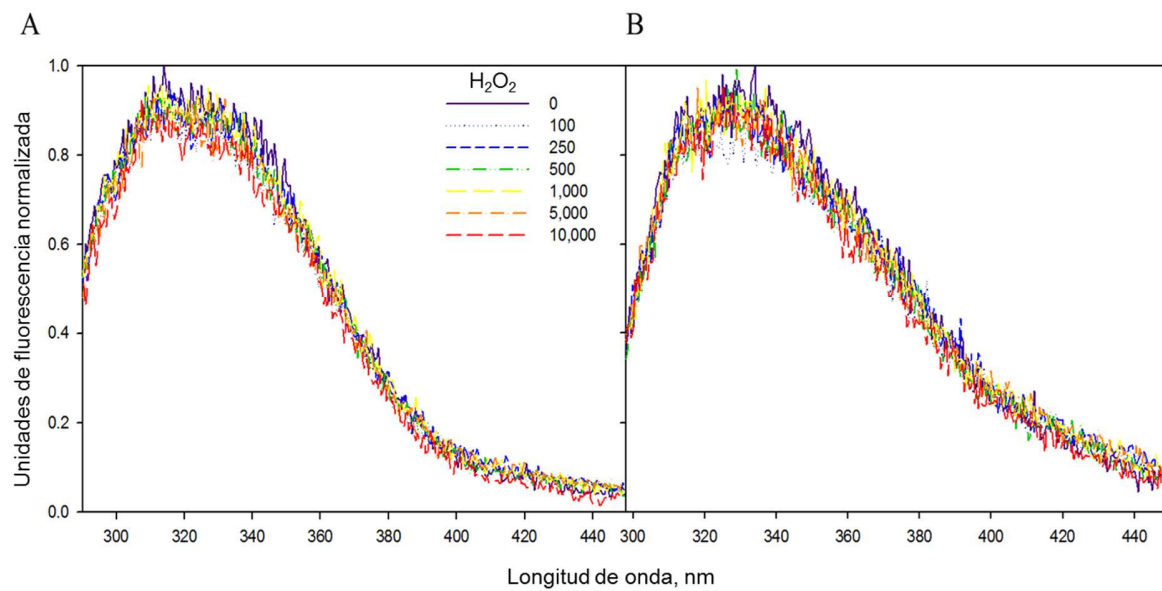


Figura A3. Espectro de fluorescencia de Trp y Trp/Tyr de VP6_U oxidada con H₂O₂. Se excitó a longitudes de onda de (A) 295 nm (Trp) y (B) 280 nm (Trp/Tyr) y se midió la emisión de luz desde 290 nm hasta 600 nm.

A4. CARBONILACIÓN DE BSA DESPUÉS DE DIFERENTES TIEMPOS DE INCUBACIÓN CON OXIDANTES

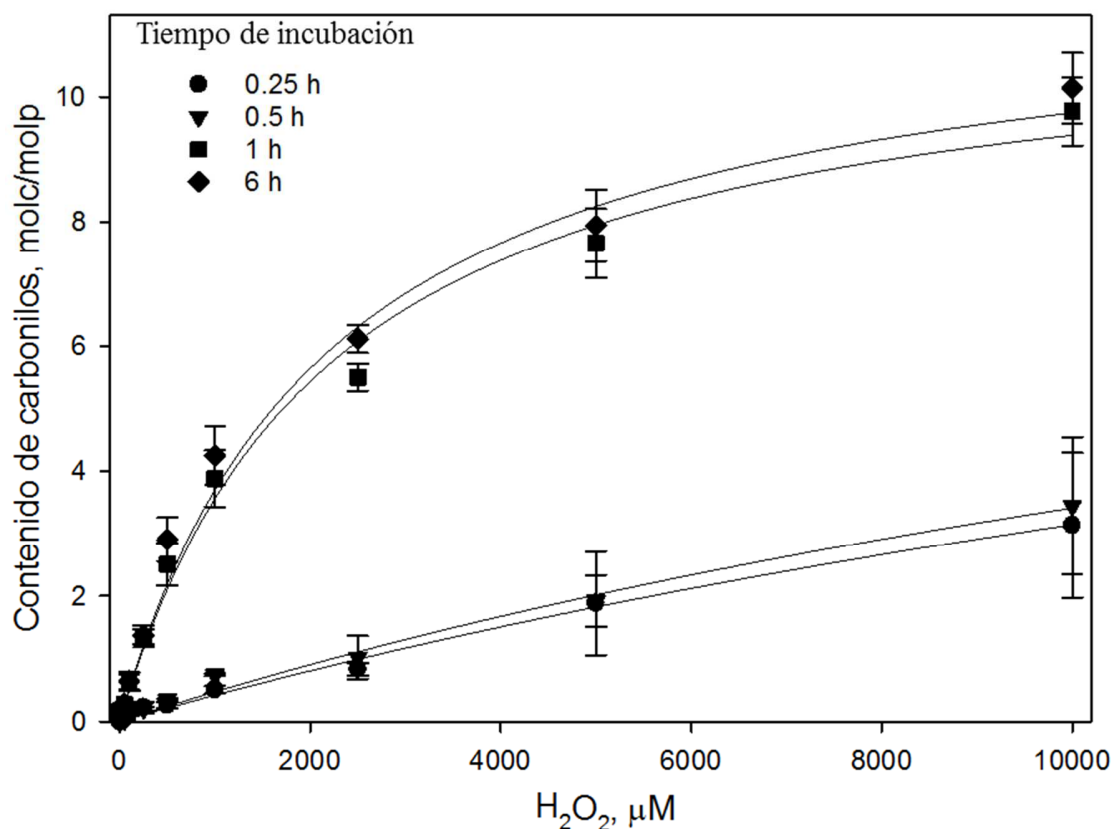


Figura A4. Carbonilación de BSA en diferentes condiciones oxidantes y tiempos de incubación. La proteína BSA se oxidó por medio de MCO con diferentes concentraciones de H₂O₂ durante 4 tiempos de incubación. La línea representa el ajuste de los datos utilizando a la ecuación 7.

Tabla A1. Coeficientes de la ecuación 7 para BSA sometida a MCO.

Tiempo de incubación, horas	[c] _{max} , molc/molp	a, μM	r ²
<i>Oxidación MCO</i>			
0.25	11.42 ± 3.24	26,336 ± 9851	0.99
0.5	11.09 ± 3.45	22506 ± 9398	0.99
1.0	11.47 ± 0.61	2,216 ± 324	0.99
6.0	11.47 ± 0.55	1858 ± 257	0.99

A5. FORMACIÓN DE BITIROSINAS EN PROTEÍNAS OXIDADAS

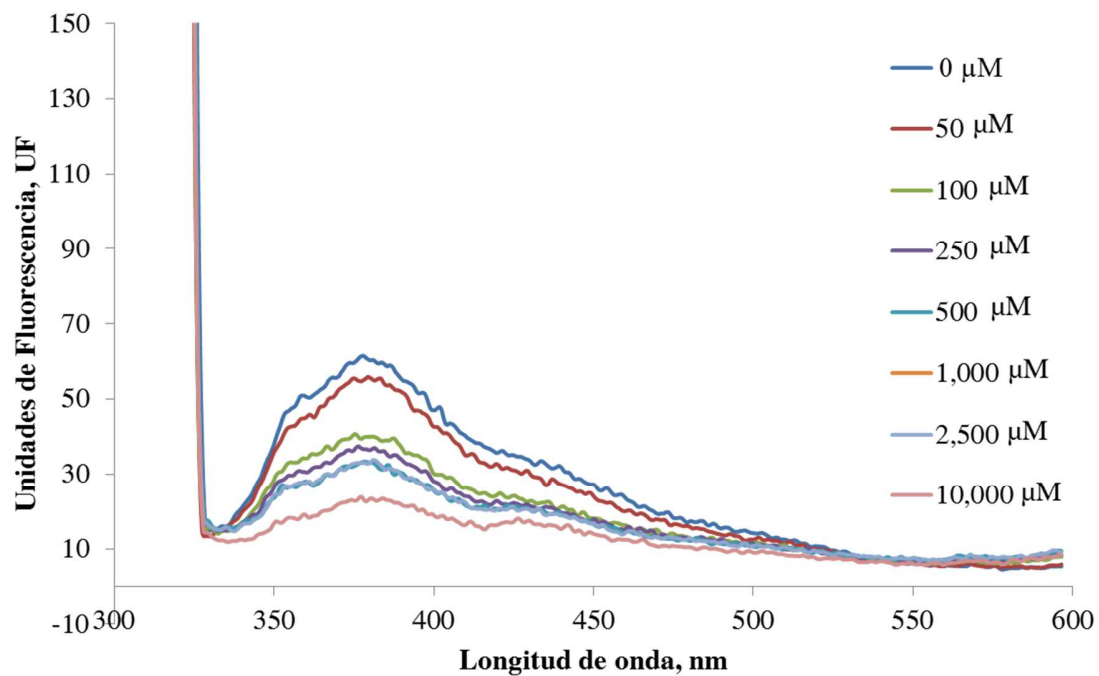


Figura A5. Ensayo de determinación de Bitirosinas en VP6. La proteína VP6 se oxidó por medio de MCO con diferentes concentraciones de H₂O₂. Se midió fluorescencia excitando a una longitud de onda de 315 nm.

A6. Castro-Acosta R.M., Rodríguez-Limas W.A., Valderrama B., Ramírez O.T., Palomares L.A. (2014). Effect of metal catalyzed oxidation in recombinant viral protein assemblies. *Microbial cell factories*. 13(1): 25.

RESEARCH

Open Access

Effect of metal catalyzed oxidation in recombinant viral protein assemblies

Ricardo M Castro-Acosta, William A Rodríguez-Limas, Brenda Valderrama, Octavio T Ramírez and Laura A Palomares*

Abstract

Background: Protein assemblies, such as virus-like particles, have increasing importance as vaccines, delivery vehicles and nanomaterials. However, their use requires stable assemblies. An important cause of loss of stability in proteins is oxidation, which can occur during their production, purification and storage. Despite its importance, very few studies have investigated the effect of oxidation in protein assemblies and their structural units. In this work, we investigated the role of *in vitro* oxidation in the assembly and stability of rotavirus VP6, a polymorphic protein.

Results: The susceptibility to oxidation of VP6 assembled into nanotubes (VP6_{NT}) and unassembled VP6 (VP6_U) was determined and compared to bovine serum albumin (BSA) as control. VP6 was more resistant to oxidation than BSA, as determined by measuring protein degradation and carbonyl content. It was found that assembly protected VP6 from *in vitro* metal-catalyzed oxidation. Oxidation provoked protein aggregation and VP6_{NT} fragmentation, as evidenced by dynamic light scattering and transmission electron microscopy. Oxidative damage of VP6 correlated with a decrease of its center of fluorescence spectral mass. The *in vitro* assembly efficiency of VP6_U into VP6_{NT} decreased as the oxidant concentration increased.

Conclusions: Oxidation caused carbonylation, quenching, and destruction of aromatic amino acids and aggregation of VP6 in its assembled and unassembled forms. Such modifications affected protein functionality, including its ability to assemble. That assembly protected VP6 from oxidation shows that exposure of susceptible amino acids to the solvent increases their damage, and therefore the protein surface area that is exposed to the solvent is determinant of its susceptibility to oxidation. The inability of oxidized VP6 to assemble into nanotubes highlights the importance of avoiding this modification during the production of proteins that self-assemble. This is the first time that the role of oxidation in protein assembly is studied, evidencing that oxidation should be minimized during the production process if VP6 nanotubes are required.

Keywords: Protein oxidation, Carbonylation, Virus-like particles, Viral protein assemblies, Assembly efficiency

Background

Protein assemblies have gained increasing importance in the biomedical field, as they are used as vaccines, delivery vehicles and nanomaterials [1-4]. Viral proteins have a primary role in the field, as many of them are capable of self-assemble to form macromolecular structures with unique properties, such as virus-like particles (VLP) and other assemblies. The production of such complex structures can be challenging, as it is not sufficient to produce a pure protein, but the desired assemblies should be

obtained in a reproducible and consistent manner [1,4]. Stability is a key property of assemblies that are to be used for pharmaceutical, biomedical or nanotechnological applications. However, proteins suffer modifications that can result in loss of stability and function. These modifications may be due to micro-environmental and environmental conditions and can occur during production, purification, formulation, storage and handling, causing irreversible changes in their quality and stability, such as deamidation, aggregation, mismatched S-S bonds and oxidation [5-7]. From these, oxidation is one of the most important, and therefore, most studied [8-10]. Oxidation has critical consequences for protein structure and function, disturbing intrinsic characteristics. *In vivo* protein oxidation

* Correspondence: laura@ibt.unam.mx
Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 510-3, C.P. 62210, Cuernavaca, Morelos, Mexico

has been related to several diseases, such as Alzheimer's, cancer, atherosclerosis and other chronic disorders [10,11].

Protein oxidation has been extensively investigated by *in vitro* studies. Several groups have worked with proteins like bovine serum albumin (BSA), IgG, lysozyme, and human α 1-antitrypsin, among others [12-16]. Oxidation reactions with 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), H_2O_2 , $\bullet OH$ or $O_2\bullet$ result in aggregation, structural damage, changes in physico-chemical properties, cleavage, and changes in protein hydrophobicity and conformation [12-16]. Oxidative damage in proteins disturbs their three-dimensional structure due to accumulation of amino acid carbonylation, backbone fragmentation, cross-linking, unfolding, increase in hydrophobicity, and conformational modifications [8-10,17,18]. Only few reports have been published for viral protein macrostructure assemblies such as virus, virus-like particles, and other highly ordered assemblies. The effect of oxidation on viruses (adenovirus, bacteriophage MS2, cowpea mosaic virus, influenza virus and norovirus) has been studied in efforts to inactivate them [19-23]. Various sources of reactive oxygen species (ROS) have been tested, such as the Fenton reaction, UV_{254} , 1O_2 , chlorine dioxide and free chlorine. ROS reacted with different sites on viral capsids, resulting in carbonyl formation, aggregation and conformational changes, as well as modifying the capsid cell binding capacity and diminishing virus infectivity [19-23]. However, to our knowledge, only a single report of the effect of oxidation on VLP exists. Tleugabulova et al. [24] studied the effect of oxidation on VLP of the hepatitis B surface antigen (HBsAg) oxidized with ammonium peroxodisulphate. Oxidation provoked VLP aggregation and cross-linking of S protein chains, leading to a complete loss of antigenicity. Such studies highlight the importance of further investigating the effect of aggregation on protein assemblies.

The structure of protein assemblies can result in an increased susceptibility to oxidation, as protein monomers are in close contact, which can result in chain reactions that could magnify the effect of ROS. Also, oxidation can damage protein assemblies, impede the assembly of monomers, or cause other alterations of the multimer. In this work, we investigated the effect of oxidation in a multimeric polymorphic protein, rotavirus VP6. Recombinant VP6 forms highly stable trimers that can self-assemble into different types of structures depending on pH and ionic strength [25,26]. VP6 assembled into trimers, nanotubes (VP6_{NT}) or icosahedra can be obtained [25,26]. VP6 nanotubes have proven to be useful as a recombinant vaccine against rotavirus [2,27], as adjuvants in other recombinant vaccines [27], and as scaffolds for the production of nanomaterials [3,28]. VP6 constitutes an ideal model for studying the effect of oxidation on protein assemblies, as its assembly is

required for its application. In this work, metal-catalyzed oxidation (MCO) was exerted upon VP6 nanotubes and unassembled VP6, in order to investigate its effect on protein degradation, carbonylation, assembly capacity, and aggregation. In this article, the susceptibility of oxidation of assembled and unassembled protein forms were compared, and the effect of oxidation on viral protein assembly is reported for the first time.

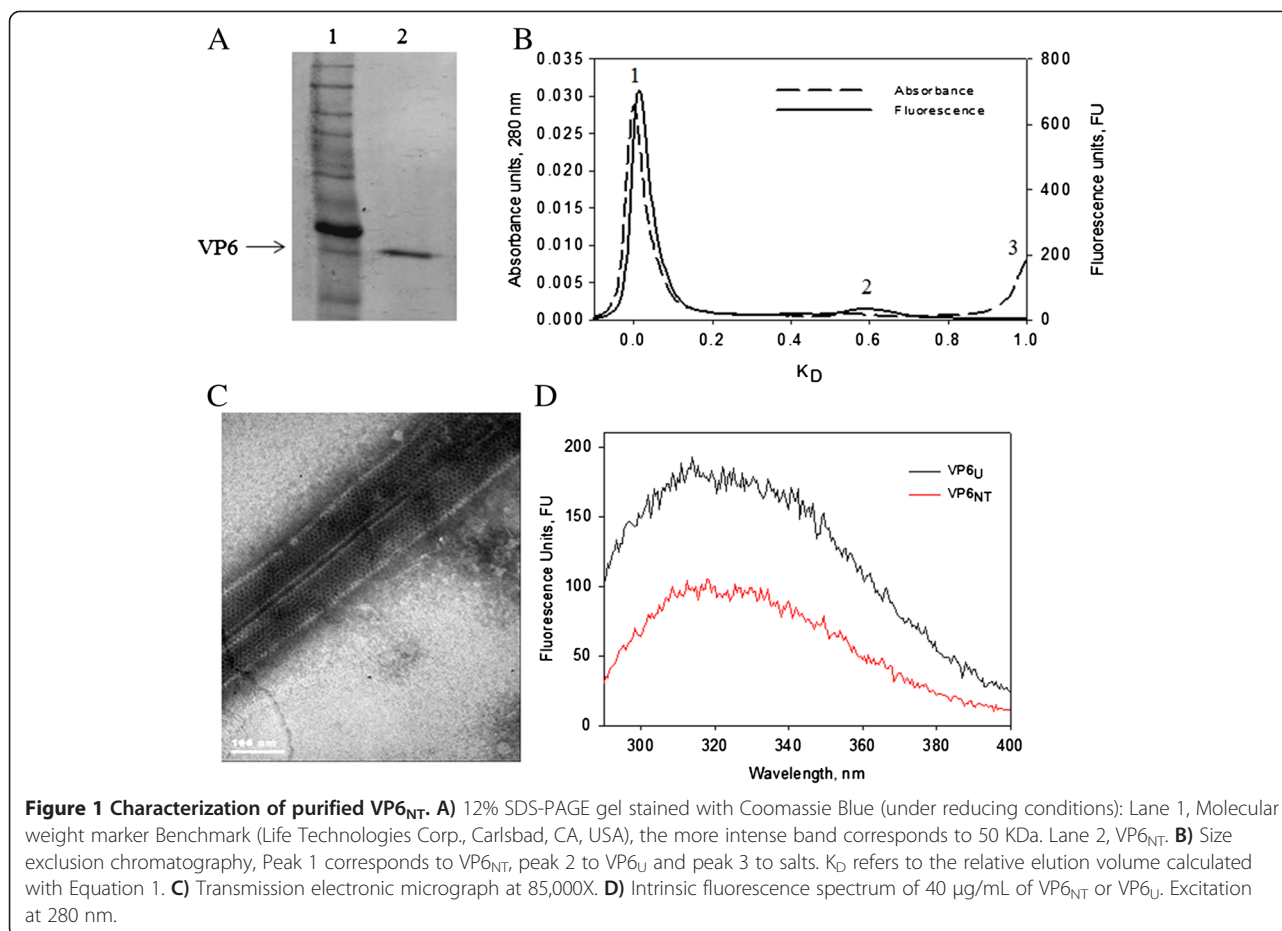
Results

VP6 nanotube characterization

A typical VP6 nanotube preparation was characterized. The purity of VP6 was confirmed in reducing denaturing SDS-PAGE gels, which showed a single band with the molecular weight reported for VP6 (Figure 1A). Size exclusion chromatography (SEC) analysis showed two populations (Figure 1B), one that migrated at the column exclusion limit (peak 1), which corresponded to VP6 nanotubes (VP6_{NT}), and a second one with smaller size identified as VP6_U (peak 2), containing unassembled VP6 monomers and trimers. The population containing VP6_{NT} constituted 95% of the total protein, which is a typical value obtained with this purification process [3,29]. The presence of VP6_{NT} structures was confirmed by TEM (Figure 1C). Intrinsic fluorescence spectra of aromatic amino acids were acquired for VP6_{NT} and VP6_U at 280 (Trp and Tyr, Figure 1D) and 295 nm (Trp). VP6_U had a fluorescence quantum yield 2 and 2.5 times higher than VP6_{NT} at 280 and 295 nm, respectively.

VP6 assembled into nanotubes is more resistant to degradation by oxidation than unassembled VP6 and BSA

Protein oxidation can result in degradation by fragmentation of the backbone, which can be evidenced by the disappearance of a stainable band in SDS-PAGE gels [15,17]. Degradation analysis was used to evaluate the susceptibility of nanotubes and disassembled VP6 to H_2O_2 . For comparison, bovine serum albumin (BSA), a widely studied protein, was also subjected to oxidation. Gels were scanned and the intensity and area of each band were quantified by densitometry. Results are shown in Figure 2. Exposure to up to 10,000 μM H_2O_2 did not cause band disappearance in gels of treated BSA, VP6_{NT} or VP6_U, even after 6 h of incubation with the oxidant (Figure 2A). As VP6 was not degraded by exposition to H_2O_2 , all following experiments were performed only with MCO. In contrast, when exposed to H_2O_2 in MCO, the VP6 and BSA bands disappeared although with different behavior (Figures 2B and C). While VP6, in either of its forms, resisted MCO up to 5 mM of H_2O_2 for 1 h, the BSA band decreased at H_2O_2 concentrations above 0.25 mM. Exposition to H_2O_2 in MCO for 6 h caused degradation of BSA at all concentrations tested, evidencing that it is less resistant to degradation than VP6. These



experiments also showed that VP6_{NT} are more resistant to oxidation than VP6_U. While the VP6_U band disappeared after exposure to 10,000 μM of H₂O₂ in MCO for 1 h, no change was observed in VP6_{NT} when incubated under the same condition. Exposure of VP6_{NT} to high H₂O₂ concentrations for as much as six hours was needed for its band to disappear, suggesting a higher stability towards oxidative insults. The same behavior was observed in native gels (data not shown).

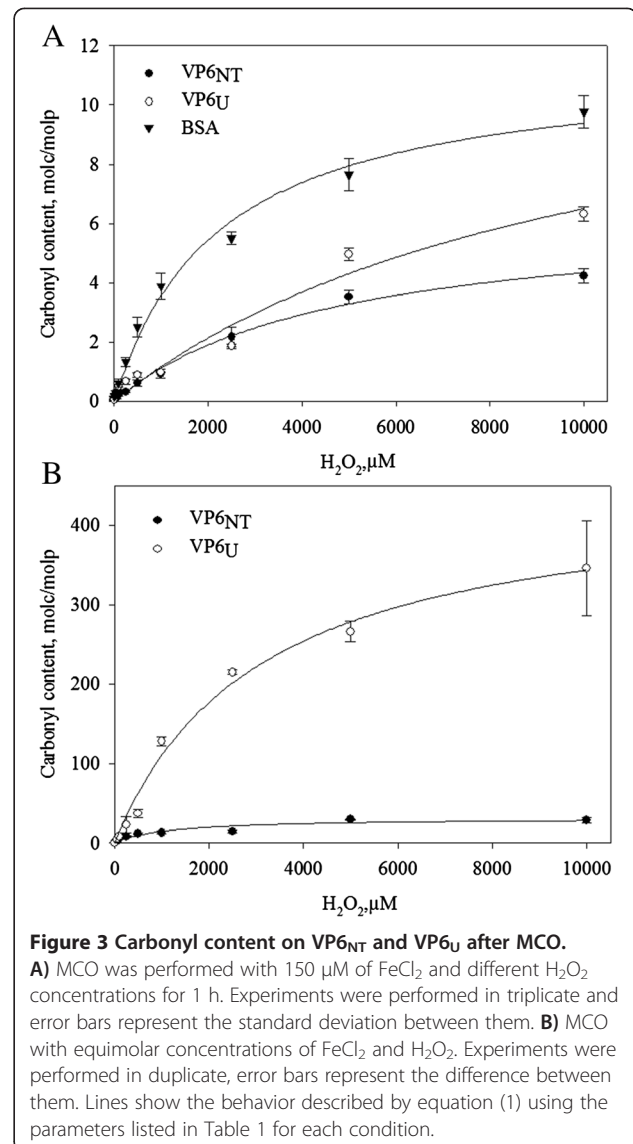
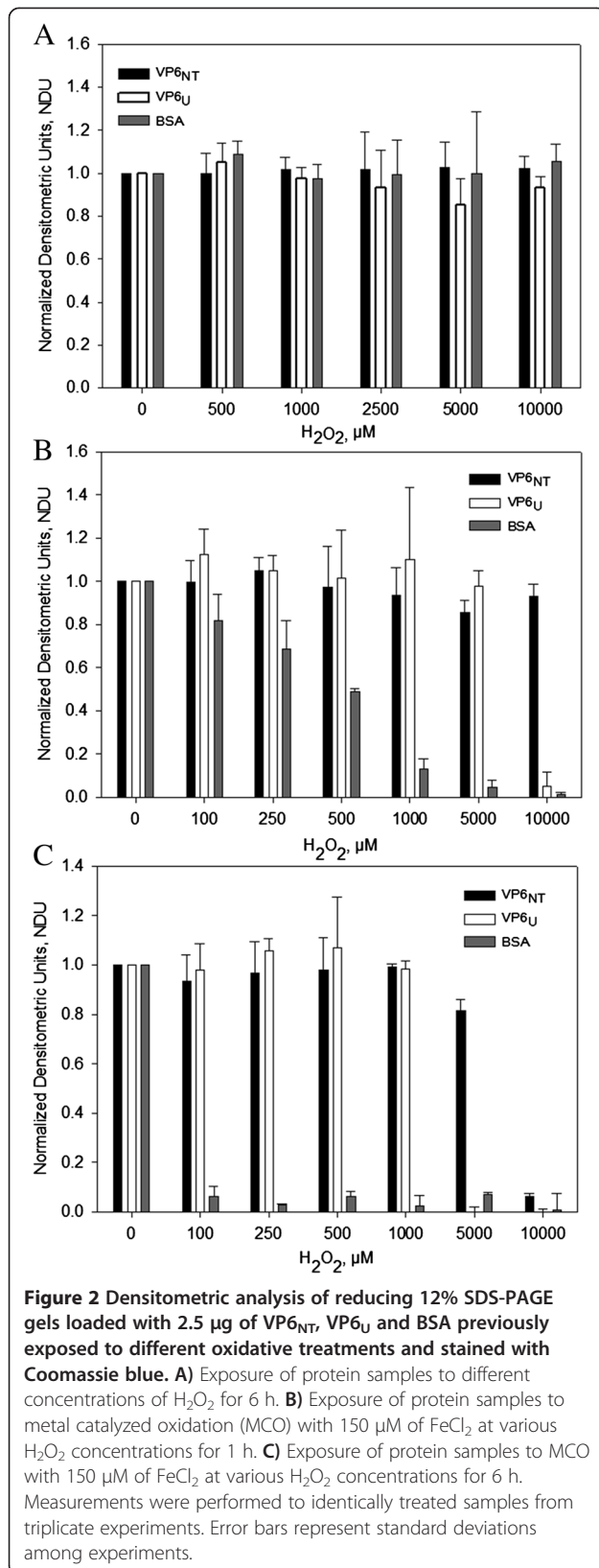
In order to further dissect the molecular impact of the oxidative damage inflicted into VP6, the carbonyl content in VP6_U, VP6_{NT} and BSA was measured after exposure to MCO at various H₂O₂ concentrations (Figure 3A). The initial carbonyl contents before oxidation were 0.069 ± 0.023 molc/molp for VP6_{NT}, 0.059 ± 0.023 molc/molp for VP6_U and 0.167 ± 0.010 molc/molp for BSA. Carbonyl content increased in all samples as H₂O₂ concentration increased, following a saturation curve. Results shown in Figure 3A were obtained maintaining the Fe⁺² concentration constant at 150 μM while increasing H₂O₂ concentration to excess. This condition can result in the formation of oxidative species other than $\bullet\text{OH}$, such as the remaining H₂O₂ or $\bullet\text{OOH}$ [8,12]. In order to restrict the formation of ROS to the $\bullet\text{OH}$ radical, the

Fenton reaction was performed at equimolar concentrations of Fe⁺² and H₂O₂ (Figure 3B). The carbonyl content under this condition was 64 times higher for VP6_U and 5 times higher for VP6_{NT} than when Fe⁺² concentration remained constant. It also followed a saturation curve.

Data sets were adjusted to the following equation describing a saturation curve:

$$[c] = \frac{[c]_{\max}[H_2O_2]}{a + [H_2O_2]} \quad (1)$$

where $[c]$ is the carbonyl content (molc/molp), $[c]_{\max}$ is the maximum carbonyl content, and a is a saturation constant. The values of the equation constants for each condition are listed in Table 1. The specific carbonyl content at saturation with constant Fe⁺² was two times higher in VP6_U than in VP6_{NT}, whereas $[c]_{\max}$ was similar for BSA and VP6_U. In an analogy with enzyme kinetics, protein susceptibility to oxidation (affinity towards the oxidant) can be inferred from a . BSA was the most susceptible to oxidation, while the susceptibility of VP6_{NT} to oxidation was two times higher than the susceptibility of VP6_U. At equimolar Fe⁺² and H₂O₂ concentrations, a



similar behavior was observed, where $[c]_{max}$ and a were 14 and 2.6 times higher in VP6_U than in VP6_{NT}, respectively.

Oxidation produced aggregation of VP6_U and fragmentation of VP6_{NT}

Oxidized samples of VP6_{NT} and VP6_U were analyzed by dynamic light scattering (DLS), transmission electron microscopy (TEM), SEC and spectrometry. The size of VP6_{NT} measured by DLS, decreased as peroxide concentration increased (Figure 4A). The mean hydrodynamic diameter of nanotubes, which was $1,067.0 \pm 206.6$ nm (corresponding to an equivalent sphere) without oxidation, decreased down to 317.5 ± 40.4 nm after exposition to 10,000 μM H₂O₂. TEM showed that oxidation provoked the disassembly of nanotubes and aggregation of the resultant unassembled VP6 (Figure 5B). In contrast, oxidation of VP6_U resulted in an increase in size,

Table 1 Coefficients in Equation 1 obtained by fitting carbonyl content at different H₂O₂ concentrations

Sample	[c] _{max} , molc/molp	a, μM	r ²
At constant [Fe ⁺²] and various [H ₂ O ₂] (Figure 3A)			
VP6 _{NT}	6.40 ± 0.43	4,745.99 ± 681.64	0.99
VP6 _U	13.28 ± 3.72	10,431.12 ± 4824.19	0.97
BSA	11.47 ± 0.61	2,216.32 ± 324.21	0.99
With equimolar H ₂ O ₂ /Fe ⁺² concentrations (Figure 3B)			
VP6 _{NT}	31.49 ± 4.16	1,154.85 ± 499.22	0.89
VP6 _U	448.73 ± 32.19	3,064.28 ± 546.32	0.99

Data were fitted using the software SigmaPlot 10.0 (Systat Software, Inc., SJ, CA, USA). Coefficient standard errors are shown.

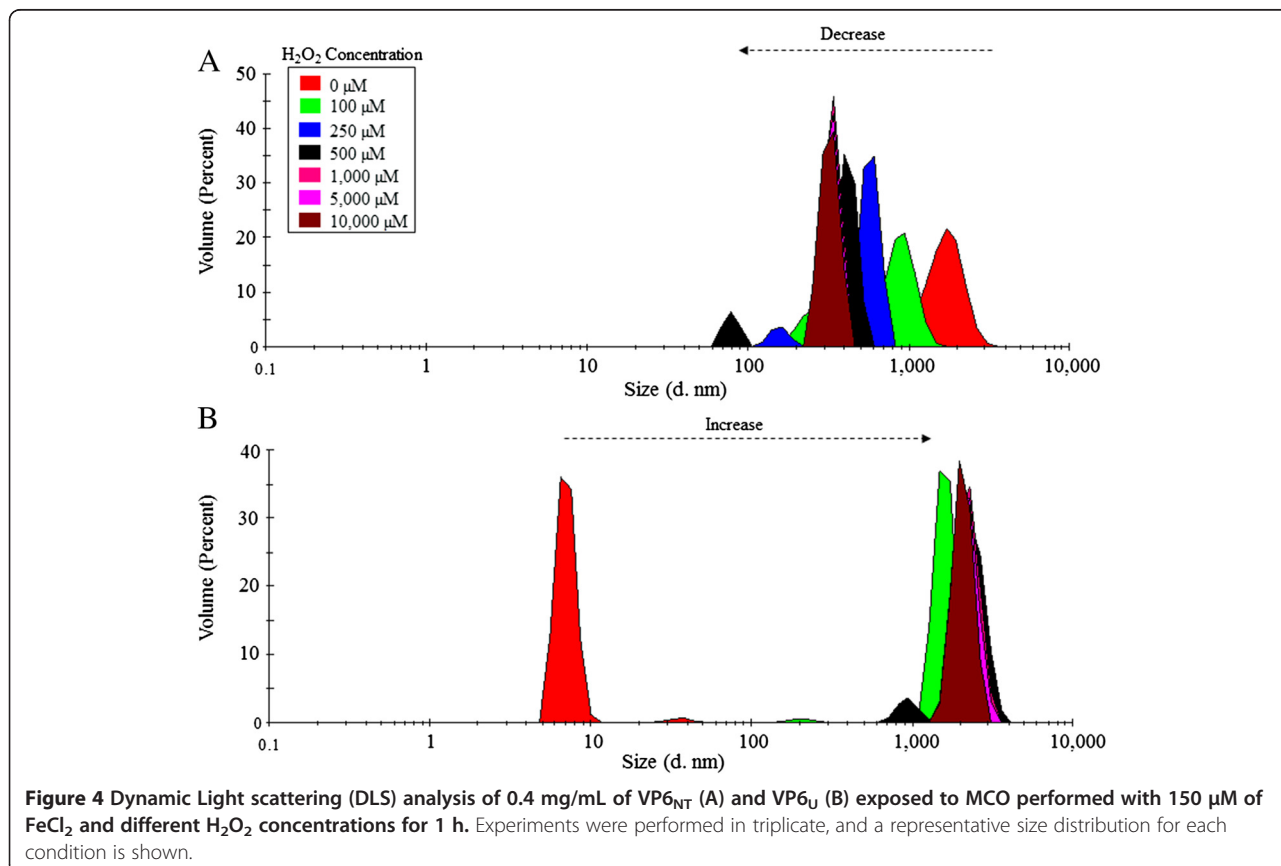
from a hydrodynamic diameter of 7.5 ± 2.6 nm to 2,085.0 ± 289.7 nm after exposition to 10,000 μM of H₂O₂ (Figure 4B). TEM showed that the increase in size of oxidized VP6_U was caused by aggregation (Figure 5C).

Another consequence of protein oxidation is dityrosine formation [30], which could have caused the aggregation observed in both types of VP6 assemblies. No dityrosines were detected in either VP6_{NT} or VP6_U (data not shown), indicating that aggregation was caused by other mechanisms, such as hydrophobic interactions or hydrogen bonding [31,32].

To further understand the effect of oxidation in VP6_{NT}, oxidized samples were analyzed by SEC, as previously described [29,33]. Absorbance at 280 nm and fluorescence of aromatic amino acids were followed (Figure 6). No changes in absorbance at 280 nm were observed in chromatograms when VP6_{NT} were oxidized with up to 1 mM of H₂O₂ (Figure 6A). Such a result was expected, as DLS analysis showed that the products of oxidation, although smaller than nanotubes, were larger than the column pore size (50 nm). However, no absorbance was detected after oxidation with 10 mM H₂O₂. In contrast with absorbance, fluorescence of aromatic amino acids decreased as H₂O₂ concentration increased. Fluorescence decreased 40% upon oxidation with 100 μM of H₂O₂, and consistently decreased until it completely disappeared at 10 mM (Figure 6B). Additional peaks were observed at 1 mM of H₂O₂, possibly smaller degradation products not detectable by absorbance.

Oxidation provoked changes in fluorescence intensity and in the center of fluorescence spectral mass (CSM)

Fluorescence emission spectra (290 nm to 600 nm) of VP6_U and VP6_{NT} subjected to MCO were recorded for Tyr/Trp (λ_{ex} 280 nm, data not shown) and Trp (λ_{ex} 295 nm, Figure 7A and B). Fluorescence of both VP6_U



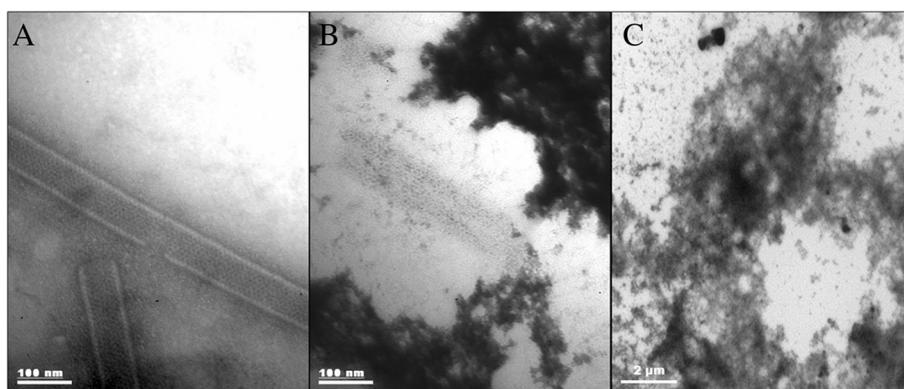


Figure 5 Transmission electronic microscopy (TEM) of VP6 (0.4 mg/mL) after MCO at 10,000 μM of H_2O_2 and 150 μM of FeCl_2 for 1 h. Samples were stained with 2% uranyl acetate. **A)** Untreated VP6_{NT} . **B)** Oxidized VP6_{NT} sample. **C)** Oxidized VP6_{U} sample.

and VP6_{NT} decreased as the concentration of H_2O_2 increased. Fluorescence decreased the most at H_2O_2 concentrations above 0.1 mM, where it diminished at least 50% in all cases. Fluorescence of VP6_{NT} had a more pronounced decrease than fluorescence of VP6_{U} , disappearing at H_2O_2 concentrations above 250 μM .

The center of fluorescence spectral mass (CSM) was calculated for each spectra (Figure 7C). For comparison, the CSM of VP6 treated for 1 h with 6 M guanidine chloride, an unfolded control, is shown at the right of the figure (CSM = $27,642 \pm 136 \text{ cm}^{-1}$). For both VP6 forms, the CSM decreased as the H_2O_2 concentration increased up to 1 mM, and reached wavelengths comparable to that of the unfolded control. At higher H_2O_2 concentrations, CSM of VP6_{U} consistently increased.

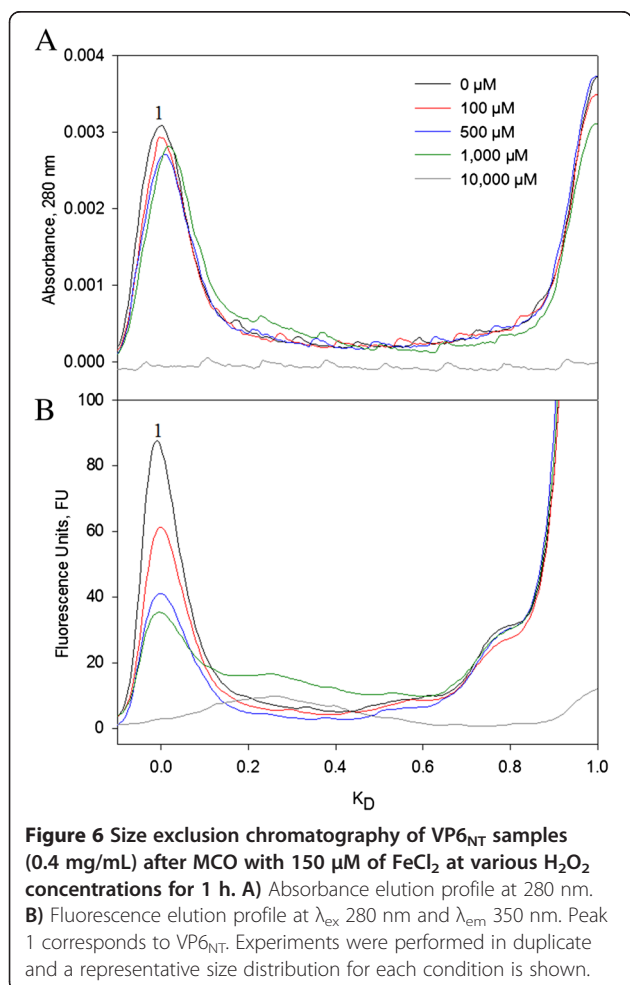


Figure 6 Size exclusion chromatography of VP6_{NT} samples (0.4 mg/mL) after MCO with 150 μM of FeCl_2 at various H_2O_2 concentrations for 1 h. **A)** Absorbance elution profile at 280 nm. **B)** Fluorescence elution profile at λ_{ex} 280 nm and λ_{em} 350 nm. Peak 1 corresponds to VP6_{NT} . Experiments were performed in duplicate and a representative size distribution for each condition is shown.

Efficiency assembly of VP6_{NT} decreased after oxidation

Oxidized VP6_{U} at various H_2O_2 concentrations was subjected to *in vitro* assembly conditions to determine if oxidation impedes its assembly into VP6_{NT} . Samples incubated for 6 h were analyzed by SEC to determine the relative concentration of assembled VP6, which elutes with the void volume of the SEC column ($K_{\text{D}} = 0$) (Figure 8A). A sample of VP6_{U} not treated for assembly is shown for comparison. VP6_{U} eluted at a K_{D} of 0.6. The peak corresponding to VP6_{U} disappeared in all samples treated for assembly, and peaks appeared at lower K_{D} . The abundance of the peak corresponding to VP6_{NT} decreased as H_2O_2 concentration increased. Assembly efficiencies were determined by SEC and calculated by dividing the area of the peak at 0 K_{D} (corresponding to VP6_{NT}) by the total peak area below 0.8 K_{D} , to exclude the salt peak (Figure 8A). VP6_{U} before being subjected to the assembly reactions is shown for comparison. Untreated VP6 assembled into VP6_{NT} with a 72% efficiency. Nanotubes with the expected characteristic were observed by TEM (Figure 9A). The assembly efficiency of oxidized VP6_{U} decreased as H_2O_2 concentration increased (Figure 8B), and the quality of the assembled VP6_{NT} decreased (Figure 9B to F). It was increasingly difficult to find assembled nanotubes as the H_2O_2 concentration increased, and those found had various defects, such as fractures, incomplete NT and association with aggregates (Figure 9B to F). Most likely

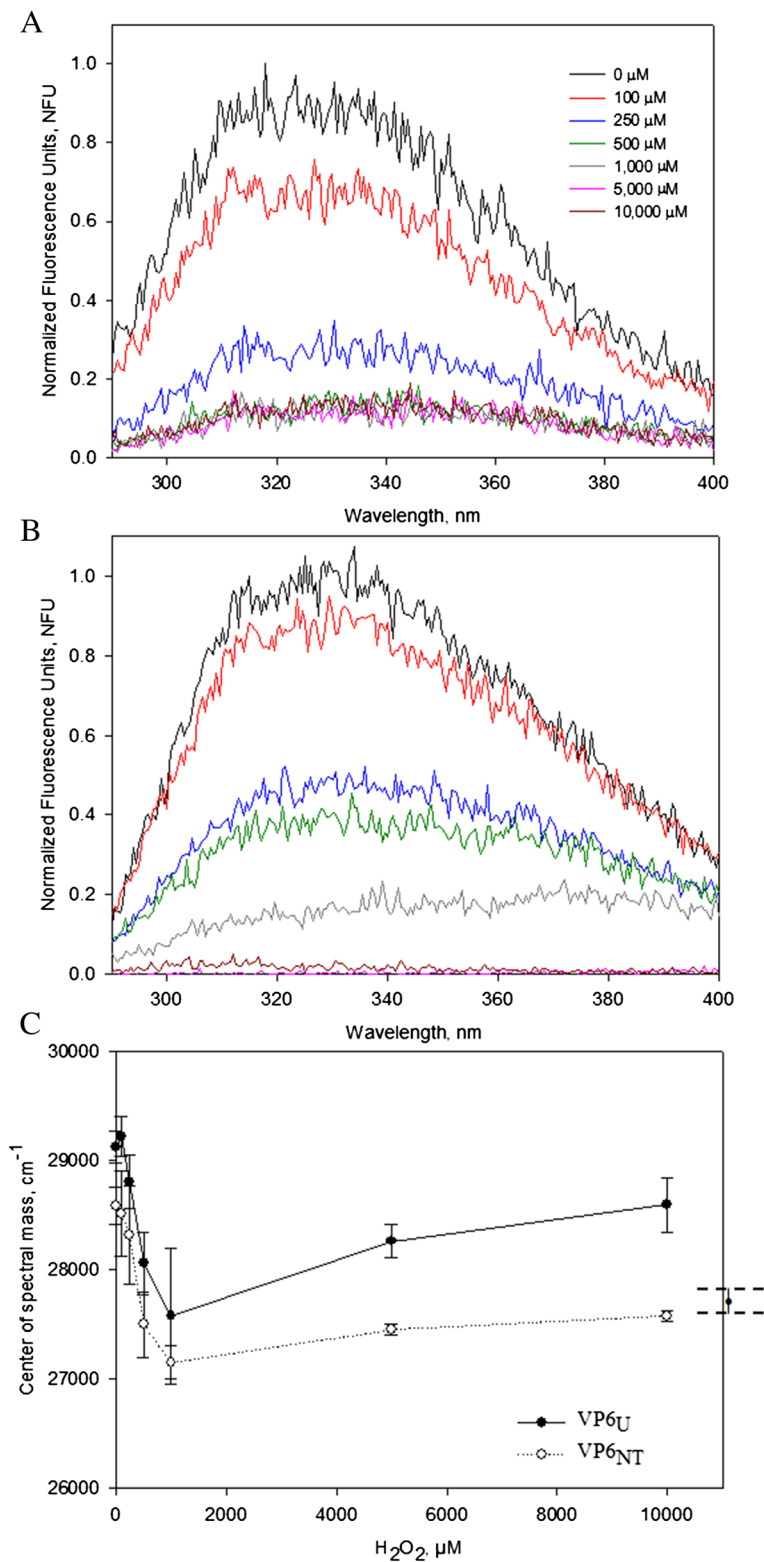
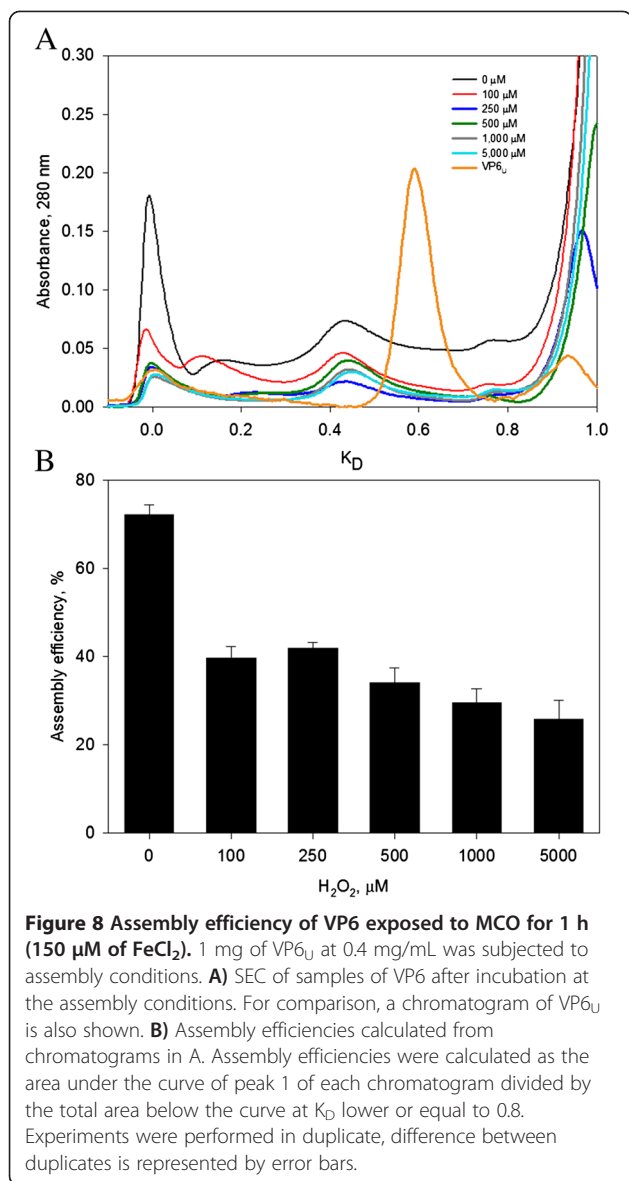


Figure 7 Emission fluorescence scans at λ_{ex} 295 nm of VP6_{NT} and VP6_U (0.4 mg/mL) after MCO with 150 μM of FeCl₂ at various H₂O₂ concentrations for 1 h. **A)** Normalized emission spectra of VP6_{NT}. **B)** Normalized emission spectra of VP6_U. **C)** The center of spectral mass (CSM) of oxidized VP6_{NT} and VP6_U was calculated using Equation (3) and plotted against the H₂O₂ concentration used. On the right, the CSM of denatured VP6 (treated for 2 hours with 6 M of guanidine chloride) is shown for comparison. Experiments were performed in triplicate, except for the CSM of denatured VP6, which was analyzed in duplicate. Error bars represent the standard deviation or difference among them.



the assembly efficiency was overestimated, as aggregation of VP6_U upon oxidation was observed.

Discussion

The importance of oxidation in the integrity of macromolecules has been widely recognized [7]. However, only one previous article has reported the effect of oxidation in a VLP, focusing mostly on the immunogenicity of a vaccine [24]. To study the effect of oxidation on protein assemblies, rotavirus VP6 in two forms, unassembled and assembled into nanotubes, was subjected to oxidation. BSA, a widely studied protein, was treated in parallel for comparison. Protein degradation, carbonylation, size, appearance assessed by TEM, spectrophotometric characterization, and assembly efficiencies were evaluated to determine the effect of oxidation on protein assemblies.

The experiments performed here showed that BSA is less resistant to oxidation than VP6. BSA was degraded by MCO at lower H₂O₂ concentrations and shorter times than VP6. Degradation of BSA by oxidation has been previously observed in SDS-PAGE gels similar to those shown here [15]. Protein degradation is a consequence of peptide bond cleavage. It has been proposed that α-amidation and diamide formation are the main mechanisms of peptide bond rupture under oxidative conditions [34-36].

Protein carbonylation is the most destructive irreversible modification caused by oxidation. It is also an excellent biomarker of oxidative stress because of its early formation and stability [37,38]. BSA was less resistant to carbonylation than VP6. Carbonyl contents found here were similar to those previously reported for BSA [15,36]. The higher susceptibility of BSA to damage by oxidation is probably the result of its higher content of lysine, arginine, proline and threonine (RKPT), 149 residues/mol, in comparison with the 82 residues/mol in VP6. The side chains of RKPT amino acids are the most important precursors of carbonylated compounds [34,39]. The constants obtained from data fitting to Equation 1 provide information about the carbonyl content at H₂O₂ saturation and the susceptibility of the protein to carbonylation. At 150 μM of Fe²⁺ and 10,000 μM of H₂O₂, the carbonyl content in BSA was close to saturation. Also, the value of *a* for BSA was the lowest, in accordance with the experimental observations that BSA was less resistant to oxidation than VP6 in either of its assembled forms. In addition to its higher number of RKPT residues, BSA has 35 cysteines, forming 17 disulfide bonds, while VP6 has only 8 cysteines and no disulfide bonds. Cysteines are also highly susceptible to oxidation, forming a wide variety of compounds [40].

The fluorescence emission of unassembled and assembled VP6 showed that the microenvironment of Tyr and Trp residues are different in both assemblies. The quantum yield of VP6_U was twice that of VP6_{NT}, possibly because Trp residues are exposed to the solvent only in VP6_U (as visualized from the crystal structure reported previously [26]). While for VP6_U, the Tyr and Trp residues exposed to the solvent are 18 and 8, respectively, for VP6_{NT} only 3 Tyr are exposed [25].

The experiments performed here show that the extent of oxidation of assembled VP6 is lower than that of VP6_U, suggesting that number of oxidizable amino acids that are exposed to the solvent is more important for overall protein oxidation than chain reactions that can be triggered by ROS and propagate the damage to the protein assembly. VP6 assembly into nanotubes may result in additional protection to VP6, as the VP6 nanotube lumen is not freely accessible to ions [28]. In the two sets of carbonylation reactions performed, VP6_U had the highest maximum carbonyl content, supporting the idea

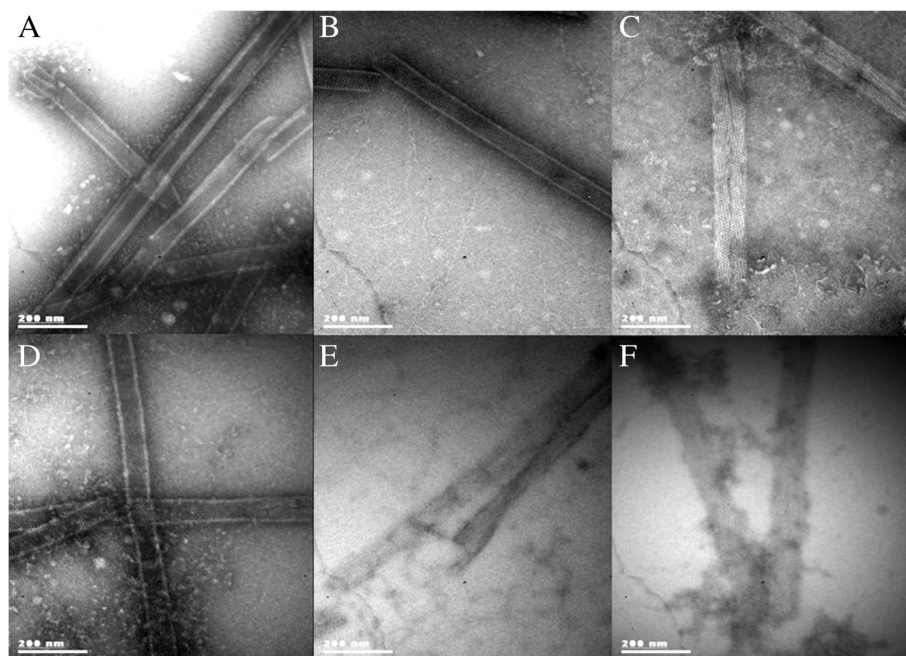


Figure 9 TEM micrographs of VP6_U subjected to assembly conditions after exposure for 1 h to MCO. **A)** Nanotubes obtained after assembly of untreated VP6_U. Other panels, MCO with **B)** 100 μM **C)** 250 μM **D)** 500 μM **E)** 1,000 μM **F)** 5,000 μM of H₂O₂. Samples were stained with 2% uranyl acetate and observed at a magnification of 85,000X.

that a higher protein area exposed to the solvent results in more oxidation. However, the value of a from Equation 1 was lower for VP6_{NT}, indicating that even when fewer amino acids were oxidized, they were more readily accessible to ROS. The higher susceptibility of VP6_{NT} to oxidation was accompanied by a steeper decrease in fluorescence, suggesting that the aromatic amino acids exposed to the surface were the more susceptible to oxidation. The maximum carbonyl content obtained in VP6_U was similar to the number of amino acids in VP6. As certain amino acids are more susceptible to carbonylation than others, this suggests that each oxidized amino acid generated more than one carbonyl group.

DLS analysis showed that oxidation provoked the disassembly of VP6_{NT} and the aggregation of VP6_U, probably caused by carbonylation. Changes in hydrophobicity due to carbonylated amino acid residues induce protein aggregation [38]. Also, accumulation of oxidized dysfunctional proteins with reactive carbonyl groups can lead to inter- and intramolecular cross-links with amino groups [41]. No formation of dityrosines was found, indicating that aggregation had a different cause, possibly hydrophobic interactions, hydrogen bonding or free thiol groups cross-linking [31,32]. Aggregation and nanotube disassembly have important impacts on possible applications of VP6_{NT}. Aggregation has been linked with protein immunogenicity [42], and nanotubes are required for the use of VP6 as an efficient vaccine or as a delivery vehicle

[2,43]. Interestingly, MCO of HBsAg VLP did not produce aggregation even at higher oxidant concentrations (100 mM of H₂O₂ and 100 μM of Fe⁺²) than those evaluated in the present work.

Fluorescence emission spectra drastically changed upon oxidation of both VP6 forms. Fluorescence emission decreased as H₂O₂ concentration increased. Similar results were described by Davies and coworkers [17], who observed fluorescence quenching of aromatic amino acids, mainly Trp, after oxidation with •OH and •OH + O₂⁻ radicals. Oxidative damage to proteins includes oxidation of aromatic rings, resulting in non-fluorescent derivatives [44]. CSM also decreased as H₂O₂ increased up to 1 mM of H₂O₂, moving towards the CSM of the unfolded VP6 control, most likely caused by a partial denaturation of VP6 [45,46]. The CSM at 295 nm correlates with the microenvironment surrounding Trp residues, which can be in a relaxed structure (hydrophilic, lower CSM values) or in a compact structure (hydrophobic, higher CSM values) [45,47]. The CSM of VP6_{NT} remained lower than that of VP6_U at all conditions tested, indicating that aromatic amino acids remained in a more hydrophilic environment in VP6_{NT} than in VP6_U. CSM of both VP6 forms increased at H₂O₂ concentrations above 1 mM, probably as a result of aggregation.

Oxidation decreased the assembly capacity of VP6_U by about half, even at only 100 μM of H₂O₂. All the modifications provoked by oxidation described above can result in

a lower assembly efficiency of VP6. Either conformational changes or modification of the amino acids in intratrimer or intertrimer regions can impede assembly. For example, Erk and coworkers [48] replaced the His 153 of VP6 with Ser, resulting in a protein that can assemble into trimers but not into nanotubes. Moreover, aggregation provoked by oxidation can also reduce the assembly efficiency into nanotubes. Interestingly, oxidation resulted in nanotubes that had several defects, indicating that even when oxidized VP6 could assemble, the resulting assemblies were less stable. The results obtained highlight the importance of impeding oxidation during the production, purification and storage of protein assemblies and their subunits.

Conclusions

In this work, the role of oxidation on multimeric protein assembly was described for the first time. Differential effects of the susceptibility of oxidation of a protein assembled or unassembled were found. The results presented here show that oxidation can cause important changes to assembled and unassembled VP6, affecting the protein functionality. *In vitro* assembly of VP6_U to form VP6_{NT} decreased with oxidation, evidencing that ROS have to be minimized during the production process when VP6_{NT} are needed. *In vitro* studies of protein oxidation are useful tools for development of new bioprocess to reduce the impact of oxidation on therapeutic proteins produced in heterologous systems. The results of this work show that oxidation must to be avoided in all production stages, including upstream, downstream, handling and storage.

Methods

VP6 nanotube production, purification and characterization

VP6 nanotubes were produced using the insect cell-baculovirus expression vector system (IC-BVS) as described before [29]. Briefly, High Five[®] insect cells (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) were grown in 1 L shake flasks with 200 mL of Sf900II medium (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Cells were infected at 1×10^6 cell/mL with a recombinant baculovirus (AcMNPV) that contains a rotavirus VP6 gene (strain SA11), at a multiplicity of infection (MOI) of 1 plaque forming unit (pfu)/cell. Infected cultures were harvested at 96 hours post infection (hpi) and centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 minutes. Clarified supernatants were concentrated by ultrafiltration using a nitrocellulose membrane with a 30 kDa cut-off (Merck, Billerica, MA, USA). Purification of VP6 assembled as nanotubes (VP6_{NT}) was performed as described previously [29]. Total protein content was determined using the Bradford assay (Bio-rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and sample purity was calculated from densitometry of reducing denaturing SDS-PAGE gels. VP6 identity was confirmed by Western blot using a polyclonal rabbit

serum against NCDV rotavirus (1:4000 dilution in PBS-T), an anti-rabbit IgG-HRP antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) (1:4,000 in PBS-T) and developed with carbazole. A prestained molecular weight marker, Dual Color, was used for Western blot experiments (Bio-rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

The presence of VP6 assemblies, such as VP6_{NT}, was detected by size exclusion HPLC (SEC) [29,33] in a Waters chromatographic system (Waters Corp., MA, USA) with an UV diode array detector at 205, 260 and 280 nm and a fluorescence detector set at λ_{ex} 280 nm and λ_{em} 350 nm (for aromatic amino acid fluorescence). Protein separation was performed using an Ultrahydrogel 500 size exclusion column (Waters Corp., MA, USA) with an isocratic flow of 0.9 mL/min of Tris buffer (10 mM, pH 8.0). The size exclusion column was calibrated with purified protein standards of lysozyme (hydrodynamic radius, $R_H = 1.8$ nm), trypsinogen ($R_H = 2.2$ nm), green fluorescence protein ($R_H = 2.4$ nm), ovoalbumin ($R_H = 2.8$ nm), bovine serum albumin ($R_H = 3.5$ nm), mouse immunoglobulin G (5.3 nm), and 30 nm standard fluorospheres ($\lambda_{ex} = 505$ nm, $\lambda_{em} = 515$ nm, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The column void volume (V_0) was determined with 100 nm standard fluorospheres and the total column volume (V_t) was determined with sodium azide. The partition coefficient (K_D) of each protein was calculated using the following equation:

$$K_D = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad (2)$$

where V_e is the elution volume of the protein peak.

The hydrodynamic size of VP6_{NT} was determined by dynamic light scattering (DLS) in a Zetasizer Nano (Malvern Inst. Ltd, Worcestershire, UK) at 173° backscatter using a normal resolution mode. Sizes are reported as the diameter of the equivalent sphere of the particles analyzed. Samples for transmission electron microscopy (TEM) were placed over 200 mesh copper grids coated with Formvar-carbon (Structure Probe Inc., West Chester, PA, USA) and stained with 2% uranyl acetate (Structure Probe Inc., West Chester, PA, USA) for 1 min and visualized in a Zeiss EM 900 transmission electron microscope (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) operated at 80 KV.

Disassembly and assembly of VP6

VP6_{NT} were disassembled by adding 300 mM of Ca⁺² and incubating for 6 h at 27°C with constant agitation in a Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hauppauge, NY, USA) [33]. For reassembly, VP6 samples at 0.4 mg/mL were mixed with 10 volumes of 100 mM sodium bicarbonate (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) at pH 8.0 to precipitate calcium and centrifuged at 5,000 rpm for 10 min.

Supernatants were collected and concentrated through a 30 kDa cut-off membrane in an Amicon ultrafiltration device (Merck Millipore Corp, Billerica, MA, USA).

Protein oxidation

VP6_{NT} and VP6_U were oxidized with two oxidants, H₂O₂ (Fermont, Monterrey, Mexico) or •OH (obtained through the Fenton reaction, Fe²⁺/H₂O₂), using various H₂O₂ concentrations (50, 100, 250, 500, 1,000, 2,500, 5,000 and 10,000 μM). For the Fenton reaction, a constant concentration of 150 μM of Fe²⁺ (as FeCl₂, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) was maintained, unless otherwise noted. In some experiments, Fe²⁺/H₂O₂ in equimolar concentrations were used. Oxidation with •OH is referred as metal-catalyzed oxidation (MCO) throughout the text. Samples were incubated at 27°C for 1 and 6 h. Oxidized VP6_{NT} and VP6_U were analyzed by SDS-PAGE (denaturing and non-denaturing conditions), SEC, DLS and TEM. 2.5 μg of protein were used for each MCO condition in SDS-PAGE experiments.

Detection and quantification of protein carbonylation

Protein carbonylation was detected by immunoblotting using the Oxyblot™ kit (Merck Millipore Corp, Billerica, MA, USA), following manufacturer instructions: 1 μg of protein was incubated with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) for 25 minutes, followed by addition of 0.5% β-mercaptoethanol (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). The reaction products were resolved by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was incubated with a rabbit anti-DNP antibody (1:300 dilution in PBS-T), and a goat anti-rabbit-HRP antibody (1:2000 dilution in PBS-T) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). A molecular weight marker, containing oxidized proteins, was loaded into all gels as a positive control. Densitometric analyses were performed using the ImageJ Software (NIH, USA).

Total carbonyl content was quantified using the method described by Guedes and coworkers [15], with some modifications: 40 to 80 μg of VP6 were derivatized with 160 μL DNPH (10 mM) for 1 h at room temperature in the dark, then samples were washed three times with TCA (20%) and centrifuged at 12,000 x g for 20 min. Supernatants were discarded and pellets were washed three times with 160 μL of ethanol/ethyl acetate solution (1:1, v/v) to remove DNPH excess. Finally, the pellet was dissolved in 100 μL of 6 M guanidine hydrochloride and incubated at 37°C for 10 min. Absorbance was measured at 370 nm in a Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA). The carbonyl content was calculated using an absorption coefficient of 22,000 M⁻¹ cm⁻¹ [36].

Dityrosine formation and intrinsic fluorescence of aromatic amino acids

Dityrosine formation was detected using fluorescence emission at 320 to 500 nm, at an excitation wavelength of 315 nm, with a slit width of 2.5 nm and a scan speed of 50 nm/min. Temperature was controlled at 27°C. Data were acquired with the FLWinlab software (Perkin Elmer Instruments, MA; USA).

Fluorescence scans were performed with a Luminis- cence spectrometer LS55 (Perkin Elmer Instruments, MA, USA) at excitation wavelengths of 280 or 295 nm using a slit width of 2.5 nm. Emission spectra were recorded from 280 to 600 nm using a slit width of 2.5 nm and a scan speed of 50 nm/min. Temperature was controlled at 27°C. Data were acquired with the FLWinlab software (Perkin Elmer Instruments, MA; USA) and the center of fluorescence spectral mass (CSM) was calculated using the following equation [45]:

$$CSM = \frac{\sum_{280\text{ nm}}^{500\text{ nm}} v_i * RFU}{\sum_{280\text{ nm}}^{500\text{ nm}} RFU} \quad (3)$$

where v_i represents the wavenumber (cm⁻¹) and RFU the relative fluorescence units.

Abbreviations

AAPH: 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride; BSA: Bovine serum albumin; c: Carbonyl; CSM: Center of fluorescence spectral mass; DLS: Dynamic light scattering; HBsAg: Hepatitis B surface antigen; K_p: Partition coefficient; MCO: Metal catalyzed oxidation; p: Protein; RFU: Relative fluorescence units; ROS: Reactive oxygen species; SEC: Size exclusion chromatography; TEM: Transmission electron microscopy; V₀: Column void volume; V_t: Total column volume; VP6_{NT}: VP6 nanotubes; VP6_U: Unassembled VP6.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

RMCA performed the study design and the experimental work, participated in the data analysis and manuscript writing. WARL and BV participated in the study design, data analysis and manuscript writing. OTR participated in the study design, data analysis and critically revised the manuscript. LAP conceived and coordinated the study, participated in the study design, data analysis and manuscript writing. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

Technical assistance by Vanessa Hernández, Ana Ruth Pastor, Guadalupe Zavala and Alba Lecona. TEM at the electron microscopy units of IBT-UNAM and the INSP, México. Funding by PAPIIT-UNAM IT-200113. RCA was supported by CONACyT and the Sistema Nacional de Investigadores during his graduate studies.

Received: 14 January 2014 Accepted: 10 February 2014

Published: 17 February 2014

References

1. Palomares LA, Ramírez OT: Challenges for the production of virus-like particles in insect cells: the case of rotavirus-like particles. *Biochem Eng J* 2009, **45**:158-167.
2. Pastor AR, Rodríguez-Limas WA, Contreras MA, Esquivel E, Esquivel-Guadarrama F, Ramírez OT, Palomares LA: The assembly conformation of

- rotavirus VP6 determines its protective efficacy against rotavirus challenge in mice. *Vaccine*. in press.
- Plascencia Villa G, Saniger JM, Ascencio JA, Palomares LA, Ramírez OT: Use of recombinant rotavirus VP6 nanotubes as a multifunctional template for the synthesis of nanobiomaterials functionalized with metals. *Biotechnol Bioeng* 2009, **104**:871–881.
 - Rodríguez-Limas WA, Sekar K, Tyo KE: Virus-like particles: the future of microbial factories and cell-free systems as platforms for vaccine development. *Curr Opin Biotechnol* 2013, **24**:1089–1093.
 - Hawe A, Wiggendorff M, van de Weert M, Garbe JH, Mahler H, Jiskoot W: Forced degradation of therapeutic proteins. *J Pharm Sci* 2012, **101**:895–913.
 - Li S, Schöneich C, Borchardt RT: Chemical instability of protein pharmaceuticals: mechanisms of oxidation and strategies for stabilization. *Biotechnol Bioeng* 1995, **48**:490–500.
 - Torosantucci R, Schöneich C, Jiskoot W: Oxidation of therapeutic proteins and peptides: structural and biological consequences. *Pharm Res* 2013:1–13. <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-013-1199-9>.
 - Meucci E, Mordente A, Martorana G: Metal-catalyzed oxidation of human serum albumin: conformational and functional changes. Implications in protein aging. *J Biol Chem* 1991, **266**:4692–4699.
 - Dean R, Fu S, Stocker R, Davies M: Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 1997, **324**:1–18.
 - Barelli S, Canellini G, Thadikaran L, Cretz D, Quadroni M, Rossier JS, Tissot JD, Lion N: Oxidation of proteins: basic principles and perspectives for blood proteomics. *Proteom Clin Appl* 2008, **2**:142–157.
 - Goetz ME, Luch A: Reactive species: a cell damaging route assisting to chemical carcinogens. *Cancer Lett* 2008, **266**:73–83.
 - Baron CP, Refsgaard HH, Skibsted LH, Andersen ML: Oxidation of bovine serum albumin initiated by the Fenton reaction-effect of EDTA, tert-butylhydroperoxide and tetrahydrofuran. *Free Radic Res* 2006, **40**:409–417.
 - Liu D, Ren D, Huang H, Dankberg J, Rosenfeld R, Cocco MJ, Li L, Brems DN, Remmele RL Jr: Structure and stability changes of human IgG1 Fc as a consequence of methionine oxidation. *Biochemistry* 2008, **47**:5088–5100.
 - Hu D, Qin Z, Xue B, Fink AL, Uversky VN: Effect of methionine oxidation on the structural properties, conformational stability, and aggregation of immunoglobulin light chain LEN. *Biochemistry* 2008, **47**:8665–8677.
 - Guedes S, Vitorino R, Domingues R, Amado F, Domingues P: Oxidation of bovine serum albumin: identification of oxidation products and structural modifications. *Rapid Commun Mass Sp* 2009, **23**:2307–2315.
 - Mulinacci F, Capelle MAH, Gurny R, Drake AF, Arvinte T: Stability of human growth hormone: influence of methionine oxidation on thermal folding. *J Pharm Sci* 2011, **100**:451–463.
 - Davies K, Delsignore M, Lin S: Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *J Biol Chem* 1987, **262**:9902–9907.
 - Hawkins CL, Davies MJ: Generation and propagation of radical reactions on proteins. *BBA-Bioener* 2001, **1504**:196–219.
 - Sano D, Pintó RM, Omura T, Bosch A: Detection of oxidative damages on viral capsid protein for evaluating structural integrity and infectivity of human norovirus. *Environ Sci Technol* 2009, **44**:808–812.
 - Meunier S, Strable E, Finn M: Crosslinking of and coupling to viral capsid proteins by tyrosine oxidation. *Chem Biol* 2004, **11**:319–326.
 - Rule Wigginton K, Menin L, Montoya JP, Kohn T: Oxidation of virus proteins during UV₂₅₄ and singlet oxygen mediated inactivation. *Environ Sci Technol* 2010, **44**:5437–5443.
 - Bounty S, Rodríguez R, Linden KG: Inactivation of Adenovirus Using Low-Dose UV/H₂O₂ Advanced Oxidation. *Water Res* 2012, **46**:6273–6278.
 - Ogata N: Inactivation of influenza virus haemagglutinin by chlorine dioxide: oxidation of the conserved tryptophan 153 residue in the receptor-binding site. *J Gen Virol* 2012, **93**:2558–2563.
 - Tleugabulova D, Falcón V, Pentón E, Sewer M, Fleitas Y: Aggregation of recombinant hepatitis B surface antigen induced in vitro by oxidative stress. *J Chromatogr B* 1999, **736**:153–166.
 - Lepault J, Petitpas I, Erk I, Navaza J, Bigot D, Dona M, Vachette P, Cohen J, Rey FA: Structural polymorphism of the major capsid protein of rotavirus. *EMBO J* 2001, **20**:1498–1507.
 - Mathieu M, Petitpas I, Navaza J, Lepault J, Kohli E, Pothier P, Prasad BV, Cohen J, Rey FA: Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion. *EMBO J* 2001, **20**:1485–1497.
 - Blazevic V, Lappalainen S, Nurminen K, Huhti L, Vesikari T: Norovirus VLPs and rotavirus VP6 protein as combined vaccine for childhood gastroenteritis. *Vaccine* 2011, **29**:8126–8133.
 - Carreño-Fuentes L, Ascencio JA, Medina A, Aguila S, Palomares LA, Ramírez OT: Strategies for specifically directing metal functionalization of protein nanotubes: constructing protein coated silver nanowires. *Nanotechnology* 2013, **24**:235602.
 - Plascencia-Villa G, Mena JA, Castro-Acosta RM, Fabián JC, Ramírez OT, Palomares LA: Strategies for the purification and characterization of protein scaffolds for the production of hybrid nanobiomaterials. *J Chromatogr B* 2011, **879**:1105–1111.
 - Giulivi C, Davies KJ: Dityrosine: a marker for oxidatively modified proteins and selective proteolysis. *Methods Enzymol* 1994, **233**:363–371.
 - Mahler HC, Friess W, Grauschopf U, Kiese S: Protein aggregation: pathways, induction factors and analysis. *J Pharm Sci* 2009, **98**:2909–2934.
 - Auer S, Dobson CM, Vendruscolo M: Characterization of the nucleation barriers for protein aggregation and amyloid formation. *HFSP J* 2007, **1**:137–146.
 - Mena JA, Ramírez OT, Palomares LA: Quantification of rotavirus-like particles by gel permeation chromatography. *J Chromatogr B* 2005, **824**:267–276.
 - Stadtman E, Levine R: Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 2003, **25**:207–218.
 - Garrison WM: Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chem Rev* 1987, **87**:381–398.
 - Headlam HA, Davies MJ: Markers of protein oxidation: different oxidants give rise to variable yields of bound and released carbonyl products. *Free Radic Bio Med* 2004, **36**:1175–1184.
 - Fedorova M, Bollineni RC, Hoffmann R: Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. *Mass Spectrom Rev* 2014, **33**:79–97.
 - Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R: Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003, **329**:23–38.
 - Rao R, Møller IM: Pattern of occurrence and occupancy of carbonylation sites in proteins. *Proteomics* 2011, **11**:4166–4173.
 - Jeong J, Jung Y, Na S, Jeong J, Lee E, Kim M-S, Choi S, Shin D-H, Paek E, Lee H-Y: Novel oxidative modifications in redox-active cysteine residues. *Mol Cell Proteomics* 2011, **10**:M110.000513.
 - Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN: Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**:10771–10778.
 - Singh SK: Impact of product-related factors on immunogenicity of biotherapeutics. *J Pharm Sci* 2011, **100**:354–387.
 - Rodríguez M, Wood C, Sanchez-López R, Castro-Acosta RM, Ramírez OT, Palomares LA: Understanding internalization of rotavirus VP6 nanotubes by cells: towards a recombinant vaccine. *Arch Virol*. In press.
 - Simat T, Steinhardt H: Oxidation of free tryptophan and tryptophan residues in peptides and proteins. *J Agr Food Chem* 1998, **46**:490–498.
 - Mohana-Borges R, Silva JL, de Prat-Gay G: Protein folding in the absence of chemical denaturants. Reversible pressure denaturation of the noncovalent complex formed by the association of two protein fragments. *J Biol Chem* 1999, **274**:7732–7740.
 - Vivian JT, Callis PR: Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophys J* 2001, **80**:2093–2109.
 - Lakowicz JR: *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer; 2009.
 - Erk I, Huet J-C, Duarte M, Duquerroy S, Rey F, Cohen J, Lepault J: A zinc ion controls assembly and stability of the major capsid protein of rotavirus. *J Virol* 2003, **77**:3595–3601.

doi:10.1186/1475-2859-13-25

Cite this article as: Castro-Acosta et al.: Effect of metal catalyzed oxidation in recombinant viral protein assemblies. *Microbial Cell Factories* 2014 **13**:25.

A.7. Plascencia-Villa G., Mena J.A., Castro-Acosta R.M., Fabián J.C., Ramírez O.T., Palomares L.A. (2011) Strategies for the purification and characterization of protein scaffolds for the production of hybrid nanobiomaterials. *Journal of Chromatography B*. 879: 1105-1111.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chromb

Strategies for the purification and characterization of protein scaffolds for the production of hybrid nanobiomaterials

Germán Plascencia-Villa, Jimmy A. Mena¹, Ricardo M. Castro-Acosta, Julio César Fabián, Octavio T. Ramírez, Laura A. Palomares*

Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 510-3, C.P. 62210, Cuernavaca, Morelos, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 September 2010

Accepted 13 March 2011

Available online 21 March 2011

Keywords:

Rotavirus
Nanobiomaterials
Chromatography
Multimeric proteins
Baculovirus

ABSTRACT

Rotavirus VP6 self-assembles into high order macrostructures useful as novel scaffolds for the construction of multifunctional hybrid nanobiomaterials. This application requires large quantities of high quality pure material with strict structural consistency. Strategies for obtaining high quality recombinant VP6 and different characterization techniques are explored and compared in this work. VP6 was expressed in the insect cell–baculovirus system. VP6 assemblies were selectively purified utilizing an ion exchange and size exclusion (SE) chromatography. Purification steps were monitored and characterized by dynamic light scattering (DLS), ELISA, SDS-PAGE, HPLC and Western blot. DLS showed that the initial ultrafiltration step removed small particles, the intermediate anion exchange chromatographic step completely removed the baculovirus, whereas the final size exclusion chromatography permitted the selective recovery of correctly assembled VP6 nanotubes and discrimination of non-assembled VP6, as confirmed by transmission electron microscopy. VP6 assembled into tubular structures with diameter of 75 nm and several nanometers in length. The purification yield was 20% of multimeric assemblies with a purity >98%. The resulting material was suitable for the production of functionalized hybrid nanobiomaterials through *in situ* synthesis of metallic nanoparticles.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Protein nanotubes are highly ordered self-assembled macrostructures. These multimeric arrays are functional building blocks that can direct the interaction and specific location of different functional materials and biomolecules for the fabrication of hybrid materials [1]. Protein nanotubes have a stable biocompatible structure with molecular recognition abilities and can be functionalized through bioconjugation for applications in nanomedicine, diagnostics, drug delivery, material sciences, bioelectronics, nano-composites and catalysis [1–4]. Biological

materials display remarkable unique properties that are difficult to obtain even with advanced synthetic technologies, such as carbon or inorganic nanotubes.

Protein nanotubes have been obtained from various sources, such as protein filaments, microtubules, collagen, amyloid fibers, bacterial pili and flagella, engineered peptides and complete helical viruses [1,3,5–7]. Less explored as nanobiomaterials are recombinant viral capsid proteins with self-assembly capacity. An example is rotavirus VP6, which is the major component of the icosahedral rotavirus capsid and can self-assemble into nanotubes or icosahedra depending on pH, ionic strength, divalent ion and protein concentrations [8,9]. VP6 nanotubes are hollow, homogeneous, highly organized, symmetric and robust structures that can be used as multifunctional building blocks for the construction of highly organized, integrative and functional nanobiomaterials [10]. The structural characteristics of VP6 and its intrinsic high affinity for metal ions have allowed its use as a multifunctional molecular scaffold for the synthesis of novel integrated hybrid nanobiomaterials functionalized by the *in situ* conjugation of silver, gold, platinum and palladium nanoparticles [10].

The use of recombinant viral capsid proteins as nanobiomaterials has several advantages, as fewer safety concerns exist in comparison with the synthesis of nanomaterials derived from live virus. In addition, their production is less expensive and environ-

Abbreviations: AEX, anion-exchange chromatography; bacVP6, baculovirus coding for rotavirus VP6 strain SA11; DLS, dynamic light scattering; ELISA, enzyme-linked immunoassay; IC-BEVS, insect cell–baculovirus expression vector system; MOI, multiplicity of infection; pfu, plaque forming unit; SE, size exclusion; TEM, transmission electron microscopy.

* Corresponding author. Tel.: +52 777 329 1863; fax: +52 777 313 8811.

E-mail addresses: germanpv@ibt.unam.mx (G. Plascencia-Villa), jimy.mena@cnrc-nrc.gc.ca (J.A. Mena), rcaastro@ibt.unam.mx (R.M. Castro-Acosta), faga170777@yahoo.com.mx (J.C. Fabián), tonatiuh@ibt.unam.mx (O.T. Ramírez), laura@ibt.unam.mx (L.A. Palomares).

¹ Present address: Animal Cell Technology Group, Biotechnology Research Institute, National Research Council Canada, Montreal, Quebec, Canada.

mentally friendly [2,4]. However, the production and purification of such highly ordered protein structures have their own challenges. In contrast to the production of monomeric recombinant proteins, assuring a high concentration of recombinant protein is not enough to satisfy the structural requirements for nanotechnology applications. Production and downstream processing should be aimed to maximizing assembled protein yields, and strategies for monitoring assembled protein structures during the production process need to be available. Traditional methodologies for protein purification and characterization are not sufficient to ensure the availability of required high amounts of correctly assembled macrostructures suitable for nanobiotechnology applications. Moreover, methodologies frequently used for the purification of viruses and virus-like particles have several disadvantages. High-speed preparative ultracentrifugation results in high shear forces and ionic strengths that can damage viral assemblies, provoke loss of their native activity, and result in materials with low purity that require additional purification steps, with consequent lower overall yields [11–13]. Additionally, ultracentrifugation is not practical at large scale, as it is time and labor consuming, expensive, and yields low recoveries. Chromatographic techniques are the alternative for purifying large quantities of the required multimeric materials [14]. In addition, integrative methodologies that maximize assembled protein recovery and allow the detailed characterization of the macromolecular assemblies are needed. A particular challenge is present when the insect cell–baculovirus expression system (IC–BEVS) is used for the production of multimeric proteins. Such an expression system is the most widely used for this kind of application, as it is versatile and highly productive. However, the presence of recombinant baculoviruses, which have a size and structure similar to that of recombinant nanotubes, impede the direct use of size-dependant purification steps.

In this work, down-stream processing strategies selective for VP6 tubular multimeric assemblies produced in the IC–BEVS were established along with process monitoring techniques. Purification steps were followed by dynamic light scattering (DLS), HPLC and ELISA in order to identify potential process bottlenecks. High-quality material, suitable for the synthesis of integrated hybrid nanobiomaterials, was obtained. The process designed here can be used for the production and characterization of other highly ordered macrostructures used as biological scaffolds for nanomaterials.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and recombinant protein production

High five insect cells (Invitrogen, Carlsbad, USA) were cultivated in SF900II medium (GIBCO-Invitrogen, Carlsbad, USA) in 1000 mL shaker flasks with 250 mL of working volume at 27 °C and 110 rpm. Exponentially growing cultures were resuspended in fresh medium to a viable cell density of 0.5×10^6 cell/mL and infected at a multiplicity of infection of 0.1 pfu/cell with a recombinant baculovirus (*Autographa californica* nucleopolyhedrovirus, AcMNPV) containing the rotavirus VP6 gene (strain SA11) under the very late *polh* promoter [15]. Baculovirus stocks were titrated using a cell viability assay [16]. Cell density and viability were monitored with a Coulter Counter (Coulter Electronics, Brea, USA) and by trypan blue exclusion, respectively.

2.2. SDS-PAGE, Western blot and ELISA

Protein samples were separated in a Laemmli SDS-PAGE system (12% resolving gels) stained with Coomassie blue. For immunodetection, proteins were transferred to nitrocellulose membranes

(Millipore, Billerica, USA). Membranes were blocked with 5% low-fat dried milk in PBS for 30 min, incubated for 1 h with a rabbit anti-rotavirus polyclonal serum, washed three times with 0.1% low-fat milk in PBS and incubated with a secondary goat anti-rabbit antibody conjugated with peroxidase (Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, USA) for 1 h. Peroxidase activity was detected by reaction with TMB (Invitrogen). VP6 concentration was measured with an ELISA kit (IDEIA Rotavirus, DakoCytomation (Cambridge, UK), later manufactured as ProSpecT, OXOID (Cambridge, UK), using a previously purified and characterized VP6 stock as standard.

2.3. Size distribution of viral multimeric assemblies

Size distribution of proteins was determined by size exclusion (SE) HPLC and DLS. HPLC analysis was performed as described by Mena et al. [17]. Briefly, a Waters (Milford, MA, USA) chromatographic system with an Ultrahydrogel 500 column was used in isocratic mode at a flow rate of 0.9 mL/min. The mobile phase was 10 mM Tris–HCl, 0.1 mM EDTA pH 8. Absorbance at 260 and 280 nm and fluorescence were monitored. The size exclusion column was calibrated with purified protein standards of lysozyme (hydrodynamic radius, $R_H = 1.8$ nm), trypsinogen ($R_H = 2.2$ nm), green fluorescence protein ($R_H = 2.4$ nm), ovalbumin ($R_H = 2.8$ nm), bovine serum albumin ($R_H = 3.5$ nm), mouse immunoglobulin G (5.3 nm), and 30 nm standard fluorospheres ($\lambda_{ex} = 505$ nm, $\lambda_{em} = 515$ nm, Invitrogen). The column void volume (V_0) was determined with 100 nm standard fluorospheres and the total column volume (V_t) was determined with sodium azide. The partition coefficient (K_D) of each protein was calculated with the following equation:

$$K_D = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

where V_e is the elution volume of the protein peak.

Dynamic light scattering analysis was performed in a Zetasizer Nano ZS (Malvern, Worcestershire, UK) equipped with 4 mW He–Ne 633 nm laser with a detection angle of 173° backscatter at 25 °C in a low volume (45 μ L) quartz suprasil cuvette (Hellma, Müllheim, Germany). Size distribution was obtained by intensity and volume measurements in multiple narrow mode. Measurements were performed at least in triplicate.

2.4. Transmission electron microscopy (TEM)

Micrographs were obtained in a transmission electron microscope (JEM1011, JEOL, Peabody, USA) operated at 80 kV. One drop of sample was put over a 200 mesh copper grid coated with formvar/carbon (ElectronMicroscopy Sciences, Washington, PA, USA), negatively stained by 3 min with 1% uranyl acetate and finally washed for 1 min with ultrapure water.

2.5. Purification of viral multimeric assemblies

2.5.1. Clarification and ultrafiltration

Infected cultures were harvested 96 h postinfection and clarified by centrifugation at $4000 \times g$ for 10 min at 4 °C. The clarified supernatant was recovered and protease inhibitors were added (0.3 mg/mL of aprotinin and 1 mM of leupeptin). The supernatant and eluates of intermediate chromatographic steps were concentrated in an Amicon stirred ultrafiltration cell (Millipore, Billerica, USA) using a regenerated cellulose membrane of 30,000 NMWL, applying positive pressure (<55 psi). Alternatively, a hollow fiber cartridge of 650 cm² with a NMWL of 500,000 (A/G Technology Corporation) was used to concentrate culture supernatants before chromatographic processing.

2.5.2. Anion exchange chromatography (AEX)

An ÄKTAprime system (GE Healthcare, Waukesha, USA), with absorbance (280 nm), pH and conductivity on-line monitoring, was used. A XK-16 column (GE Healthcare) was packed with 40 mL of Q-Sepharose Fast Flow resin (GE Healthcare). The column was equilibrated with at least two column volumes of buffer A (Tris-HCl 30 mM, EDTA 0.1 mM, pH 6.16) at a flow rate of 2 mL/min. Prior to injection, the pH of the concentrated supernatant was adjusted to 6.16. Twenty milliliter of the concentrated supernatant were loaded, and the first peak, containing non-adsorbed components, was collected. Bound material was eluted with a 30 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 1 M NaCl pH 6.16, and discarded.

2.5.3. Size exclusion chromatography (SEC)

Size exclusion chromatography was performed in a XK-26 column packed with 400 mL of Toyopearl HW65F resin (TOSOH Biosciences, San Francisco, USA). The column was equilibrated with at least two column volumes of buffer (Tris 30 mM, EDTA 0.1 mM, pH 8.0) at flow rate of 2.5 mL/min. The volume of concentrated sample loaded per run was 25 mL.

3. Results and discussion

The complete purification scheme developed in this work is described in Fig. 1 and step-by-step recovery yields are listed in Table 1. Each step of the purification scheme was characterized, and is described below. The starting materials for purification were clarified culture supernatants, which had typical VP6 concentrations of 280 ± 30 mg/L (Table 1). Only $31 \pm 1\%$ of VP6 remained in the cellular pellet after clarification of the supernatant. A SDS-PAGE gel of the clarified culture supernatant showed that it was composed of proteins ranging from 120 to 20 kDa. Proteins with molecular weights similar to those of baculovirus gp64 and VP6 were the main components (data not shown). gp64 is the most abundant protein of the baculovirus envelope [18] and it indicates the presence of baculovirus particles. It was expected to find VP6 assembled into VP6 nanotubes in the clarified supernatant, as Mena et al. [19] demonstrated that VP6 nanotubes assemble intracellularly.

The presence of VP6 nanotubes during the purification scheme was followed by SE-HPLC and DLS. Calibration curves for the HPLC system were constructed with the calibration standards listed in Section 2, injected at least three times each. Two linear standard curves were obtained, the first for K_D between 0 and 0.5, $R_H = 25.56(1 - K_D) - 9.99$ ($R^2 = 0.99$), and the second for K_D between 0.5 and 0.8, $R_H = 3.18(1 - K_D) + 1.13$ ($R^2 = 0.98$). Analysis of the clarified culture supernatant by SE-HPLC showed a peak with 2.8% of the total 280 nm absorbance that eluted with the void volume of the column, and thus it contained macrostructures with a $R_H > 15$ nm (peak 1, Fig. 2A). The macrostructures peak was expected to contain both VP6 nanotubes (70 nm in diameter and several micrometers in length [19]) and baculovirus particles (20 and 260 nm in diameter and length, respectively [18,20]). The 260/280 nm absorbance ratio of the macrostructure peak indicated that it contained 8% of nucleic acids (data not shown), suggesting the presence of baculovirus.

Table 1

Yield of purification steps.

Purification step	Volume (mL)	VP6 concentration ^a (µg/mL)	VP6 step yield ^b (%)	VP6 overall yield ^b (%)
Clarified supernatant	500	281.4	–	100
Ultrafiltration	250	411.8	73.1	73.1
AEX	250	271.4	65.8	48.1
Ultrafiltration	100	531	82.9	39.8
SEC	180	265.2	85.0	33.9
Ultrafiltration	50	579.5	60.0	20.5

^a As determined by ELISA in each step.

^b Refers to VP6 recovery.

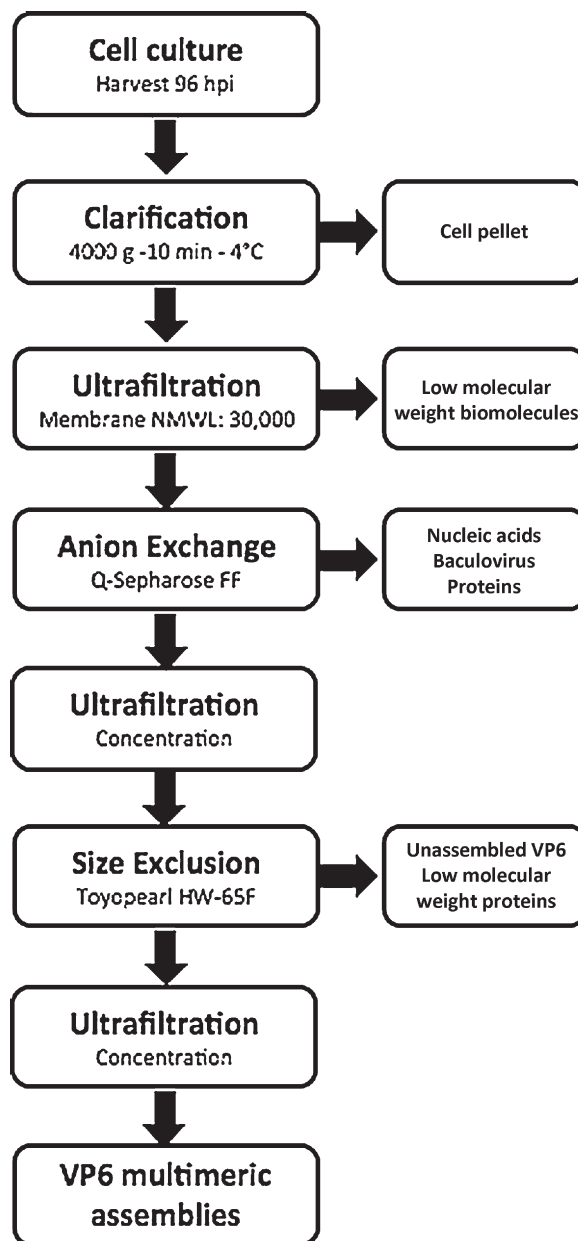


Fig. 1. Downstream purification steps for VP6 multimeric assemblies.

Other 4 peaks were detected in the SE-HPLC analysis. The second peak (mean R_H 7.7 nm) had 2.6% of the total 280 nm absorbance and did not absorb at 260 nm. The third peak had a protein content of 95%, a R_H between 6 and 2.5 nm, and 5% of nucleic acids. The fourth peak contained 30% of nucleic acids and proteins between 2.5 and 2 nm. The last peak (S) had a K_D close to 1 and corresponded to salts

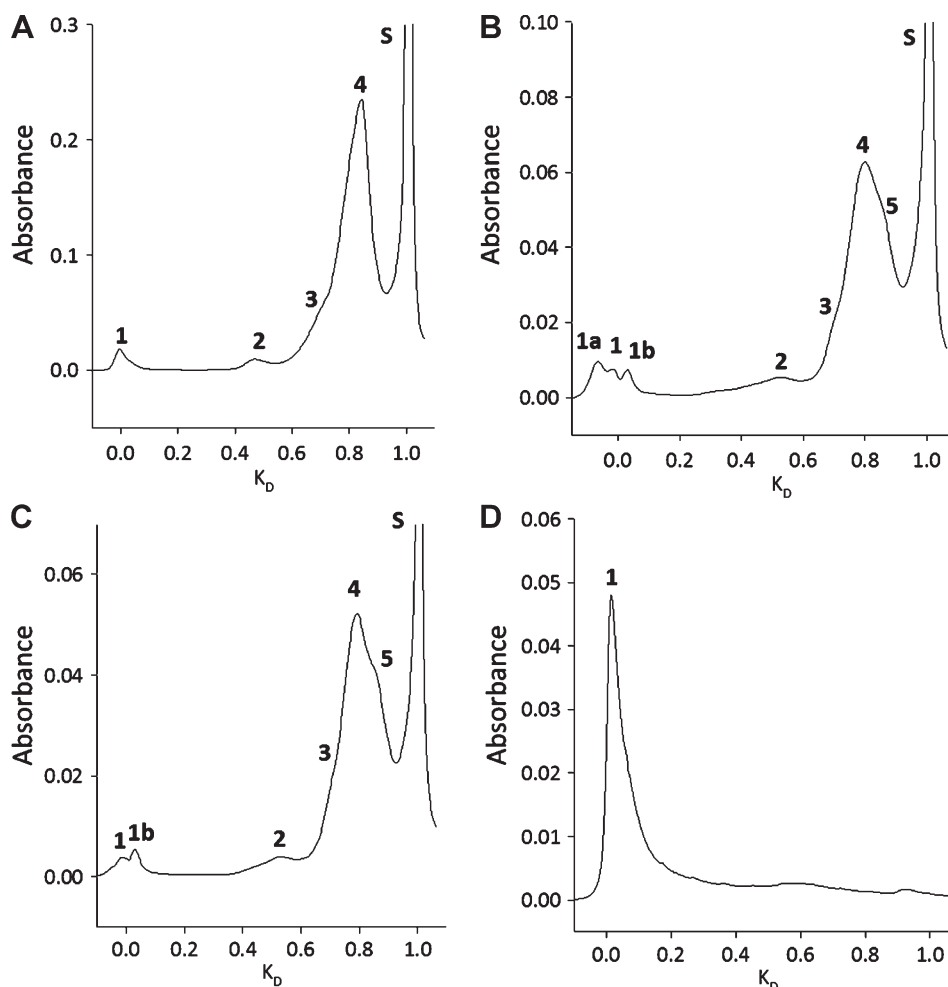


Fig. 2. Size exclusion (SE) HPLC analysis of purification steps: (A) culture supernatant; (B) concentrated supernatant; (C) peak 1 of AEX chromatography; (D) peak 1 of SEC.

present in the sample. Analysis by DLS showed that a typical culture supernatant contained particles with two size distributions, one with a mean R_H of 57 nm (73% of the volume, distribution a) and one of 170 nm (27% of the volume, distribution b) (Fig. 3A).

The next step for VP6 nanotube purification was the concentration of the clarified supernatant by ultrafiltration (Fig. 1). Two alternative configurations were tested: a hollow fiber cartridge with a NMWL of 500,000 or an Amicon stirred ultrafiltration cell. Only 55% of recombinant VP6 in the harvested supernatant was recovered after concentration in the hollow fiber cartridge, while 70% was recovered in the ultrafiltration cell. An additional advantage of the stirred cell is that it submits the nanotubes to a low shear, preventing damage of shear-sensitive viral assemblies [12]. Therefore, the ultrafiltration cell was chosen for VP6 concentration in the following steps of the purification scheme (Fig. 1).

The culture supernatant was initially concentrated to half its original volume. The presence of VP6 in the concentrated supernatant was confirmed by SDS-PAGE (image not shown). SE-HPLC analysis of the concentrated sample allowed the resolution of three peaks that eluted at a K_D close to 0, all containing macrostructures (peaks 1a, 1 and 1b, Fig. 2B). The peak in the center had a K_D similar to that of peak 1 in the non-concentrated supernatant. Peak 1a contained 15% of nucleic acids, while the other two contained less than 4%. This suggests that peak 1a corresponded to baculovirus particles, which contain viral DNA. The three macrostructure peaks had a relative abundance of 8.7%, three times more abundant than peak 1 in the non-concentrated clarified supernatant. Peak 1a had a relative abundance of 3.9% and constituted 44.8% of the

macrostructures present in the concentrated sample. Populations corresponding to peaks 2, 3, and 4 of the chromatogram of the untreated clarified supernatant were also detected in the concentrated supernatant. An additional peak, labeled as 5, was detected as a shoulder of peak 4 in the concentrated sample. Peaks 1, 1b, 2 and 5 had a protein content above 95%. Nucleic acids were present mostly in peak 4, which contained 45% of the total 280 nm absorbance and 14% nucleic acids. In comparison, DLS of the concentrated supernatant showed three defined populations of particles with average diameters of 86, 323 and 1407 nm (Fig. 3B). The population with average diameter of 1407 nm was not observed in the DLS analysis of the non-concentrated culture supernatant. According to their size, all populations detected by DLS were expected to elute with peak 1 in SE-HPLC.

DLS analysis of the filtrate of the first ultrafiltration step showed only two populations, one with a mean diameter of 54 nm and the second of 323 nm (data not shown). No presence of the population with a mean diameter of 1407 nm (corresponding to the VP6 nanotubes) was observed in the filtrate. Analyses of the concentrated supernatant and filtrate show that VP6 nanotubes were not significantly removed from the sample during the ultrafiltration step. The loss of VP6 in the concentration step was possibly a result of the removal of unassembled VP6 (Table 1).

The next step in the purification scheme was anion exchange (AEX) chromatography, which is a common step used for the effective recovery, removal or inactivation of viruses in biotechnology products [20–23]. Fig. 4A shows a typical AEX chromatogram. The pH of the equilibration and elution buffers was adjusted to 6.16,

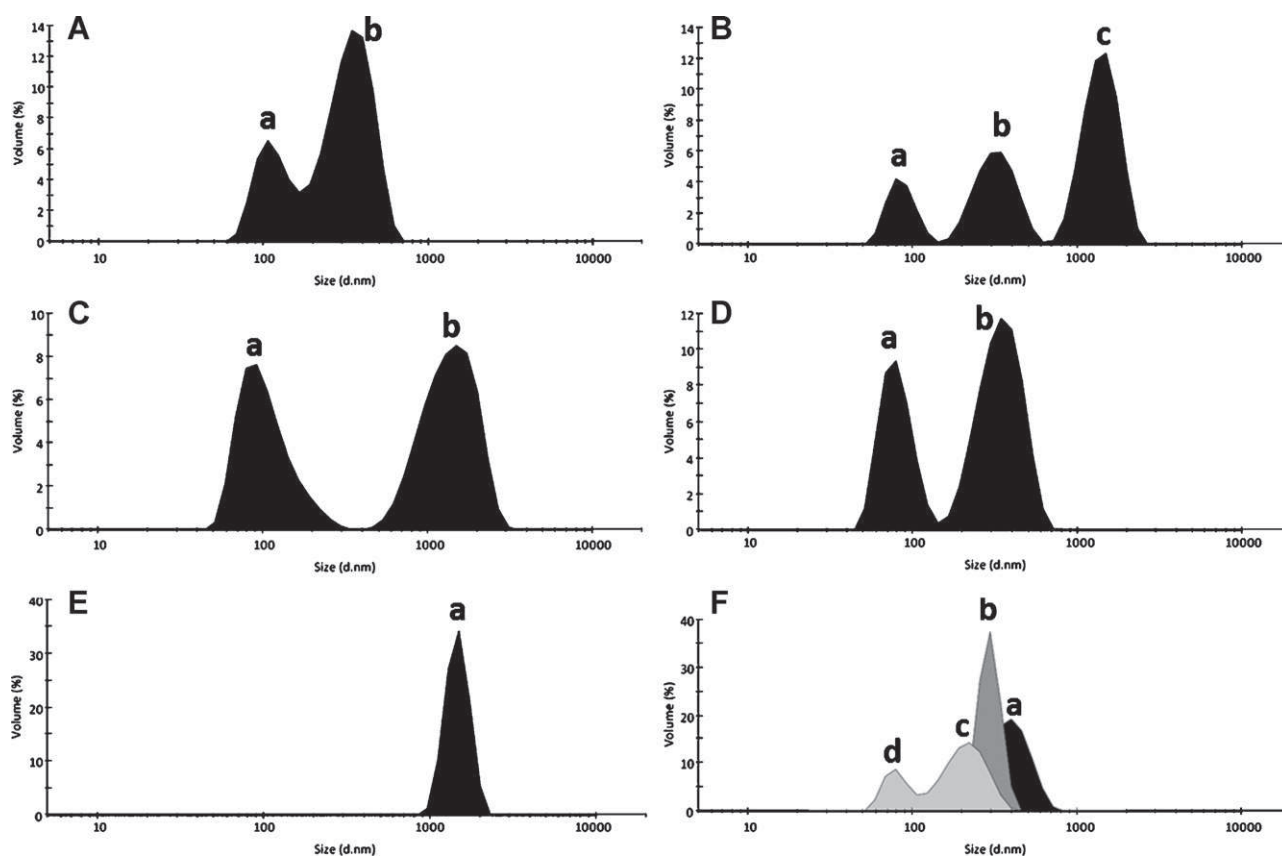


Fig. 3. Size distribution by volume of particles in the purification steps, as determined by DLS. The mean diameter of each population and their relative volume content are listed as follows: (A) Culture supernatant (population a: 115 nm, 27%; population b: 349 nm, 73%); (B) concentrated supernatant (population a: 86 nm, 14.6%; population b: 324 nm, 30.5%; population c: 1407 nm, 54.8%); (C) peak 1 of AEX chromatography (population a: 107.7 nm, 43%; population b: 1406 nm, 57%); (D) peak 2 of AEX chromatography (population a: 80.2 nm, 36.8%; population b: 348 nm, 63.2%); (E) first peak eluted from the SEC column (population a: 1461 nm, 100%); (F) other peaks eluted from the SEC column: black, peak 2 (population a: 387 nm, 100%); dark gray, peak 3 (population b: 295 nm, 100%); light gray, peak 4 (population c: 212 nm, 73.2%; population d: 80.2 nm, 26.8%).

the calculated isoelectric point of VP6, because under these conditions it was expected that nucleic acids and baculovirus gp64 interacted with the resin and remained adsorbed, while VP6 tubes flowed through. Accordingly, SDS-PAGE of peaks 1 and 2 of the AEX chromatography showed that gp64 was absent in peak 1 and abundant in peak 2, and that most VP6 did not bind to the column. AEX resins have been used to bind viruses (X-MuLV, MMV and SV40) and gp64 through electrostatic interactions [20–22,24]. The recovery yield of the AEX step was 65.8%, and the overall yield was 48.1% to this step (Table 1).

Peak 1 of AEX was analyzed by SE-HPLC (Fig. 2C). Peak 1a, present in the concentrated supernatant, was removed by AEX. This, and the absence of gp64 in peak 1 (as determined by SDS-PAGE), evidenced that baculovirus particles were eliminated by AEX. Macrostructures present in peak 1 of AEX eluted in peaks 1 and 1b of SE-HPLC, which corresponded to 4.2% of the total absorbance at 280 nm (Fig. 2C). This relative abundance was similar to that observed in the concentrated supernatant. Peaks 2, 3, 4 and 5 found in the sample of the concentrated supernatant were also observed in peak 1 of AEX, with a similar relative abundance. Analysis by DLS of peak 1 of AEX showed only two populations (a and b) with mean diameters of 108 and 1406 nm, which corresponded to 43% and 57% of the size distribution by volume, respectively (Fig. 3C). Population b had a size distribution similar to that of population c in the concentrated supernatant (Fig. 3B). The second AEX peak, which contains materials adsorbed to the column, contained also two populations but with different sizes (Fig. 3D). The first population had

a mean diameter of 80 nm and represented 37% of volume, and the second population, corresponding to 63% of the total volume, had a mean diameter of 348 nm. The particle size of the largest population is characteristic of baculovirus particles, which have 300–400 nm in length [20]. SDS-PAGE, SE-HPLC and DLS showed that the AEX step was effective for complete removal of baculovirus particles, the main contaminant in the supernatant, represented by gp64 in SDS-PAGE (image not shown). The first peak of AEX was concentrated by ultrafiltration, where 83% of the VP6 was recovered (Table 1).

In absence of baculovirus particles, size exclusion chromatography (SEC) is the best option to selectively purify assembled VP6 nanotubes, which should be the only macrostructure remaining. Thus, this was the next process in the design purification scheme (Fig. 1). The Toyopearl HW65F resin was selected for this step (average pore diameter of 100 nm). The first peak of SEC contained only highly pure (>98%) VP6 nanotubes and eluted after 150 ml of sample injection (Fig. 4B). Three additional peaks were observed. VP6 was detected in minor amounts in peaks 2 and 3. SEC VP6 recovery yield was 85% and the total yield to this step was 33.9%. DLS analysis revealed that peak 1 contained a single population ranging from 900 to 2500 nm with a mean hydrodynamic diameter of 1460 nm (Fig. 3E), whereas peaks 2, 3 and 4 contained proteins distributed in populations between 387 and 80 nm in diameter (Fig. 3F).

Peak 1 of SEC, containing VP6 nanotubes, was concentrated by ultrafiltration and further analyzed. The final concentration step had a yield of 60%, lower to that observed in previous ultrafiltration steps (Table 1). This low yield could be a result of binding of

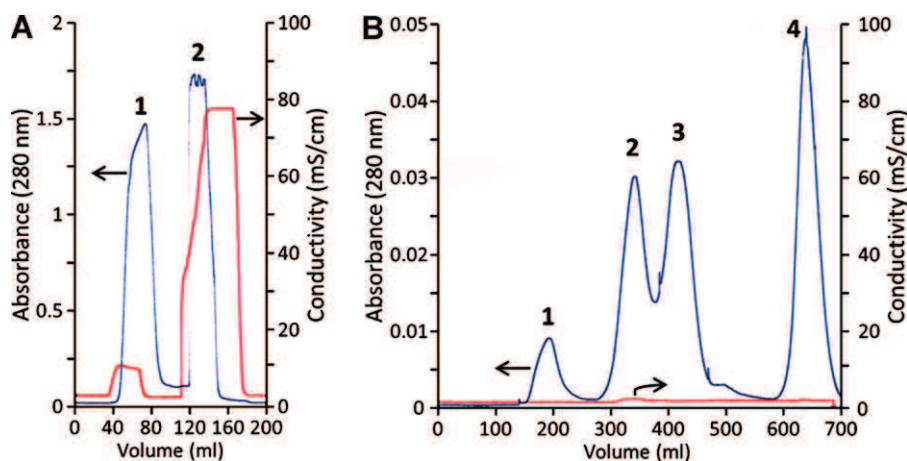


Fig. 4. Chromatograms of the chromatography purification steps: (A) anion exchange; (B) size exclusion chromatography. Absorbance (280 nm) and conductivity (mS/cm), as indicated by the arrows, are shown.

the VP6 nanotubes to the ultrafiltration cellulose membrane. SE-HPLC showed a single peak with a K_D close to 0 (Fig. 2D). Such a peak had a protein content higher than 95%, as calculated from the 260/280 absorbance ratio. SDS-PAGE analysis of the concentrated sample showed a single band with a molecular weight of 45 kDa, which corresponds to the molecular weight of VP6. No contaminant proteins were detected in the gel. The identity of the band was confirmed as VP6 by Western blot, where a single band of 45 kDa was detected. No product of degradation of VP6 was observed. The presence and morphology of VP6 assembled into nanotubes was confirmed by TEM (Fig. 5). Nanotubes with a diameter of 75 nm and various micrometers in length were observed, confirming the size distribution determined by DLS. Their structural characteristics were similar to those previously reported by Lepault et al. [8] and Plascencia-Villa et al. [10]. The surface lattice of VP6 nanotubes had a regular hexagonal pattern with the negative stain accumulated in the center of trimers and along the edges, revealing the structural consistency of the viral multimeric structures obtained (Fig. 5). The viral multimeric assemblies of VP6 purified with the downstream process described here were only nanotubes with a mean length of 1460 nm, assuming a spherical particle shape. Their size was monodisperse and ranged between 900 and 2500 nm (Fig. 3E). In comparison with TMV and M13 bacteriophage, which are viral

assemblies commonly used as biotemplates, VP6 nanotubes were over four- and two-fold longer, respectively [25,26].

The purification scheme designed in this work is summarized in Table 1 and Fig. 1. The overall yield of the purification process was 20.5%, which is low compared with purification schemes designed for individual proteins. It must be considered that only assembled VP6 was recovered. In comparison with traditional purification schemes for viral assemblies, the obtained recovery yield was 4.7 times higher than the best yields reported for ultracentrifugation schemes (1.6–4.4%) [11,13]. Furthermore, purity was increased from 9% in ultracentrifugation schemes to over 95% obtained in this work. The scheme presented here is suitable for scale-up and useful for reproducible purification at large-scale of viral multimeric structures, with a low cost and in a short process time. Moreover, the same purification scheme can be implemented to purify other viral multimeric structures produced in the IC-BEVS with minor adjustments. For example, double-layered rotavirus-like particles with 75 nm in diameter have been purified in our laboratory following the same scheme, obtaining as a product only the desired particles. The obtained VP6 nanotubes were suitable for functionalization with metals and the production of hybrid nanomaterials, as described in Plascencia-Villa et al. [10].

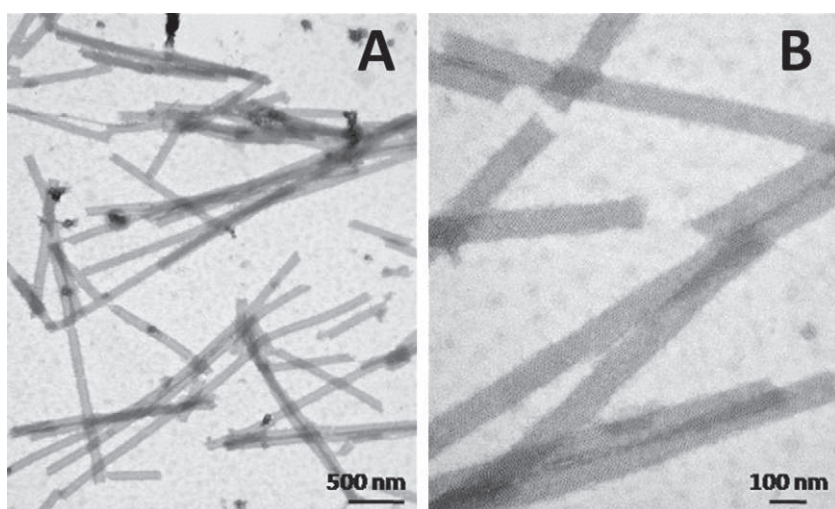


Fig. 5. Characterization by TEM of purified VP6 nanotubes: (A) 30,000 \times ; (B) 100,000 \times . The samples were negatively stained with uranyl acetate.

4. Conclusions

The development of downstream bioprocesses to obtain viral macrostructures with high compositional and structural uniformity, with high yields, in short time and with reduced cost is a challenge that must be solved for the efficient use of viral macrostructures in several fields. The IC–BEVS offers the advantage of producing correctly assembled viral multimeric proteins with high yields. However, it has the disadvantage of the presence of the baculovirus vector as byproduct. The downstream purification strategy implemented here was able to process large volumes with high yields (20.5%), in comparison with traditional time-consuming schemes. The process has a low cost and can be easily scaled-up, in contrast to traditional ultracentrifugation schemes. The final quality and purity was >98% of only correctly assembled VP6 nanotubes. The structure of the viral multimeric protein was preserved, as confirmed by SE-HPLC and DLS analysis during the purification steps and by TEM of the final product. SE-HPLC and DLS provided complementary information that aided in down-stream process design, monitoring and quantification. SE-HPLC allowed the detection of small size structures, while DLS provided information about the size distribution of macrostructures present in samples. DLS provides information of size distributions in heterogeneous samples in short time, which allows immediate process monitoring necessary for taking opportune decisions.

The purification scheme presented here produced high quality nanotubes suitable for functionalization with metals, as described previously [10]. Viral multimeric assemblies formed by rotavirus VP6 are multifunctional versatile scaffolds for the *in situ* synthesis of noble metal, magnetic and semiconductor nanoparticles that remain conjugated over the reactive amino acid residues to produce integral hybrid nanobiomaterials with high morphological consistency and multiple applications in material sciences and potential uses in nanomedicine.

Acknowledgements

Financial support by CONACyT-Salud (2007-C01-69911), SEP-CONACyT 2008-01-101847 and PAPIIT-UNAM 224409. Funding agencies had no involvement in study design or in the collection,

analysis or interpretation of data. GPV, RCA and JCF are grateful for the support of CONACyT during their graduate studies. JAM was supported during his graduate studies by DGEP-UNAM. Technical support is provided by Ana Ruth Pastor, Alba Lecona and Vanessa Hernández. Electron Microscopy Facilities are of the Instituto Nacional de Salud Pública, Mexico.

References

- [1] E.R. Ballister, A.H. Lai, R.N. Zuckermann, Y. Cheng, J.D. Mougous, Proc. Natl. Acad. Sci. 105 (2008) 3733.
- [2] S. Mann, Nat. Mater. 8 (2009) 781.
- [3] T.J. Ueno, J. Mater. Chem. 18 (2008) 3741.
- [4] S. Zhang, Nat. Biotechnol. 21 (2003) 1171.
- [5] T. Douglas, M. Young, Science 312 (2006) 873.
- [6] M. Fischlechner, E. Donath, Angew. Chem. Int. Ed. 46 (2007) 3184.
- [7] P. Singh, M.J. Gonzalez, M. Manchester, Drug. Dev. Res. 67 (2006) 23.
- [8] J. Lepault, I. Petitpas, I. Erk, J. Navaza, D. Bigot, M. Dona, P. Vachette, J. Cohen, F.A. Rey, EMBO J. 20 (2001) 1498.
- [9] J.A. Mena, R.M. Castro-Acosta, O.T. Ramírez, L.A. Palomares, Assembly kinetics of rotavirus VP6: from nanotubes to icosahedral structures, submitted for publication.
- [10] G. Plascencia-Villa, J.M. Saniger, J.A. Ascencio, L.A. Palomares, O.T. Ramírez, Biotechnol. Bioeng. 104 (2009) 871.
- [11] J. Benavides, J.A. Mena, M. Cisneros, O.T. Ramírez, L.A. Palomares, M. Rito-Palomares, J. Chromatogr. B 842 (2006) 48.
- [12] R. Morenweiser, Gene. Ther. 12 (2005) S103.
- [13] L. Pedro, S.S. Soares, G.N.M. Ferreira, Chem. Eng. Technol. 31 (2008) 815.
- [14] L.K. Pattenden, A.P.J. Middelberg, M. Niebert, D.I. Lipin, Trends. Biotechnol. 23 (2005) 523.
- [15] L.A. Palomares, S. López, O.T. Ramírez, Biotechnol. Bioeng. 78 (2002) 635.
- [16] J.A. Mena, O.T. Ramírez, L.A. Palomares, BioTechniques 34 (2003) 260.
- [17] J.A. Mena, O.T. Ramírez, L.A. Palomares, J. Chromatogr. B 824 (2005) 267.
- [18] L.A. Palomares, S. Estrada-Mondaca, O.T. Ramírez, in: S. Ozturk, W.S. Hu (Eds.), Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cellular Applications, CRC Press, New York, 2006, p. 627.
- [19] J.A. Mena, O.T. Ramírez, L.A. Palomares, J. Biotechnol. 122 (2006) 443.
- [20] T. Vicente, C. Peixoto, M.J.T. Carrondo, P.M. Alves, Gene. Ther. 16 (2009) 766.
- [21] D.M. Strauss, J. Gorrell, M. Plancarte, G.S. Blank, Q. Chen, B. Yang, Biotechnol. Bioeng. 102 (2009) 168.
- [22] D.M. Strauss, S. Lute, Z. Tebaykina, D.D. Frey, C. Ho, G.S. Blank, K. Brorson, Q. Chen, B. Yang, Biotechnol. Bioeng. 104 (2009) 371.
- [23] T. Vicente, M.F.Q. Sousa, C. Peixoto, J.P.B. Mota, P.M. Alves, M.J.T. Carrondo, J. Membr. Sci. 311 (2008) 270.
- [24] J. Kadlec, S. Loureiro, N.G. Abrescia, D.I. Stuart, I.M. Jones, Nat. Struct. Mol. Biol. 15 (2008) 1024.
- [25] E. Dujardin, C. Peet, G. Stubbs, J.N. Culver, S. Mann, Nano Lett. 3 (2003) 413.
- [26] K.T. Nam, R. Wartena, P.J. Yoo, F.W. Liao, Y.J. Lee, Y.M. Chiang, P.T. Hammond, A.M. Belcher, Proc. Natl. Acad. Sci. 105 (2008) 17227.

A.8. Rodríguez M., Wood, C., Sanchez-López R., Castro-Acosta R.M., Ramírez O.T., Palomares L.A. (2013). Understanding internalization of rotavirus VP6 nanotubes by cells: towards a recombinant vaccine. *Archives of virology*. 1-11.

Understanding internalization of rotavirus VP6 nanotubes by cells: towards a recombinant vaccine

Mabel Rodríguez · Christopher Wood ·
Rosana Sanchez-López · Ricardo M. Castro-Acosta ·
Octavio T. Ramírez · Laura A. Palomares

Received: 10 May 2013 / Accepted: 30 October 2013
© Springer-Verlag Wien 2013

Abstract Rotavirus VP6 nanotubes are an attractive option for a recombinant vaccine against rotavirus disease. Protection against rotavirus infection and an adjuvant effect have been observed upon immunization with VP6 nanotubes. However, little information exists on how VP6 nanotubes interact with cells and trigger an immune response. In this work, the interaction between VP6 nanotubes and different cell lines was characterized. VP6 nanotubes were not cytotoxic to any of the animal or human cell lines tested. Uptake of nanotubes into cells was cell-line-dependent, as only THP1 and J774 macrophage cells internalized them. Moreover, the size and spatial arrangement of VP6 assembled into nanotubes allowed their uptake by macrophages, as double-layered rotavirus-like particles also displaying VP6 in their surface were not taken up. The internalization of VP6 nanotubes was inhibited by methyl- β -cyclodextrin, but not by genistein, indicating that nanotube entry is specific, depends on the presence of cholesterol in the plasma membrane, and does

not require the activity of tyrosine kinases. The information generated here expands our understanding of the interaction of protein nanotubes with cells, which is useful for the application of VP6 nanotubes as a vaccine.

Introduction

Rotavirus causes severe diarrhea in young children and is responsible for about 40 percent of hospitalizations of children under the age of five [1]. Efficient live vaccines against rotavirus are now on the market [2]. However, there is still a need for recombinant vaccines that are safer and faster to produce and develop [3]. An excellent alternative for such a recombinant vaccine is rotavirus VP6, which has been shown to induce a strong immune response and provide protection against rotavirus infection [4–6]. VP6 forms the intermediate layer of the rotavirus capsid, assembling over the nucleocapsid formed by VP2. Even when VP6 does not induce neutralizing antibodies, it has been shown that mice immunized with VP6 are protected against rotavirus infection, as measured by a decrease in

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00705-013-1916-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. Rodríguez · R. M. Castro-Acosta · O. T. Ramírez ·
L. A. Palomares (✉)
Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto
de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México,
Apdo. Postal. 510-3, 62250 Cuernavaca, MOR, Mexico
e-mail: laura@ibt.unam.mx

M. Rodríguez
e-mail: mabel@ibt.unam.mx

R. M. Castro-Acosta
e-mail: rcastro@ibt.unam.mx

O. T. Ramírez
e-mail: tonatiuh@ibt.unam.mx

C. Wood
Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología
Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional
Autónoma de México, Apdo. Postal. 510-3, 62250 Cuernavaca,
MOR, Mexico
e-mail: chris@ibt.unam.mx

R. Sanchez-López
Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de
Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México,
Apdo. Postal. 510-3, 62250 Cuernavaca, MOR, Mexico
e-mail: rosana@ibt.unam.mx

rotavirus shedding [7, 8]. Protection is conferred by transcytosis of immunoglobulins through epithelial cells, where they inhibit viral replication. VP6 also induces a strong CD4⁺ T-cell response that reduces viral shedding by the secretion of immune-modulating cytokines such as IFN- γ and IL-17 [9, 10].

When only VP6 is recombinantly expressed, it assembles into nanotubes, spheres or trimers, depending on the pH and ionic strength. VP6 nanotubes of several micrometers in length and 75 nm or 45 nm in diameter are obtained at pH values between 5.5 and 7 and above pH 7, respectively. Additionally, icosahedral particles are observed under acidic pH (3.5–5.5) conditions [11, 12]. Recently, it was observed that VP6 nanotubes have an adjuvant effect when they are coadministered to mice with norovirus-like particles, increasing the neutralizing antibody response against noroviruses [13]. Moreover, immunization of mice with VP6 nanotubes elicits an antibody response that correlates with protection against challenge with rotavirus and confers a higher degree of protection than immunization with double-layered rotavirus particles (dIIRLP; containing VP2) or VP6 trimers [14].

The potential of protein nanotubes to induce strong immune responses has been demonstrated by others. Ghosh et al. [15] obtained strong humoral responses towards peptides when they were displayed in the nonstructural NS1 protein of bluetongue virus, which assembles into nanotubes. However, no information exists about the properties of protein nanotubes that make them better immunogens than other assemblies. Tubular structures have unique characteristics that can determine their immunogenicity. The distance between epitopes is different than in spherical particles [16], and they have a high aspect ratio. It has been shown that epitope density affects IgG responses. When administered to mice, tubular structures have longer circulation times than spherical particles [17].

The aim of this study is to understand the interaction of VP6 nanotubes with cells *in vitro* in order to obtain information that explains their high immunogenicity and adjuvant effect. The study is focused on macrophages, which are immune modulator cells [18]. It was shown that VP6 nanotubes selectively enter macrophages. In contrast, double-layered spherical particles or denatured VP6 did not enter macrophages. Nanotube internalization was inhibited by methyl- β -cyclodextrin (M β CD) but not by genistein, indicating that a high cholesterol concentration in the cell membrane is needed and that entry does not require the activity of tyrosine kinases. This work contributes to our understanding of the mechanisms involved in the high efficiency of VP6 nanotubes as a potential vaccine.

Materials and methods

Production and purification of VP6 nanotubes and dIIRLP

VP6 nanotubes and dIIRLP were produced in an insect cell-baculovirus expression vector system using High Five[®] cells cultured in shake flasks (500 mL). For the production of nanotubes, cultures at a cell concentration of 0.5×10^6 cells/mL were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1 plaque forming units (pfu)/cell with a recombinant baculovirus (bacVP6) that contains the gene of rotavirus VP6 (strain SA11) under the *polh* promoter (kindly provided by Dr. S. López, UNAM). Cultures were harvested 96 h later and centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. Culture supernatants were concentrated three times using a stirred ultrafiltration cell (Amicon, Millipore, USA) with a cellulose membrane with 30 kDa molecular weight cutoff (Millipore, USA). The purification process consisted of anion exchange and gel permeation chromatography in an AKTA Prime chromatography system (GE Healthcare, USA) as described previously [19]. The presence and purity of VP6 were confirmed by SDS-PAGE and western blotting. The average size of nanotubes was determined by dynamic light scattering using a Zeta Sizer Nano (Malvern Instruments, USA) and by electron microscopy. VP6 nanotubes were deposited on a 200-mesh Formvar carbon-coated copper grid (Electron Microscopy Sciences, Washington, PA), stained with 1 % uranyl acetate, and observed in an EM900 Zeiss transmission electron microscope (TEM) operated at 80 kV. Spherical dIIRLP composed of VP2 and VP6 rotavirus proteins were produced using a similar protocol. In this case, culture flasks were coinfecting with recombinant baculoviruses containing the genes of the rotavirus proteins VP6 and the fusion protein GFPVP2 (RF, bacGFPVP2, kindly donated by Professor Cohen, INRA, France), at an MOI of 1 pfu/cell [20]. Purified VP6 nanotubes and dIIRLP were quantified using a Bradford protein assay (Bio-Rad).

Cell culture

CaCo-2, HEK-293 and COS-7 cell lines were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma) supplemented with 10 % (v/v) fetal bovine serum (FBS, Invitrogen, USA). The monocyte cell line THP1 and the macrophage cell line J774 were cultured in Advanced RPMI Reduced Serum Medium (Gibco, Invitrogen) supplemented with 10 % (v/v) FBS, 2 mM glutamine (Sigma) and 0.05 mM β -mercaptoethanol (Sigma). In order to differentiate THP1 cells from monocytes to macrophages, 50 ng/mL of phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) (Calbiochem, Merck) was added to the cells 96 h before

performing the cytotoxicity and internalization experiments. In the case of J774 cells, the same amount of PMA was added to cells for 48 h to increase their phagocytic capacity. Cells were cultured at 37 °C in a humidified 5 % CO₂ atmosphere. Viability and total cell concentrations were determined using a hemacytometer (Fullerton, CA, USA).

Cytotoxicity assays

CaCo-2, HEK-293 and COS-7 cells were seeded in 96-well plates at a cell concentration of 10⁴ cells/well in DMEM supplemented with 10 % (v/v) FBS. The following day, the culture medium was removed and cells were washed with PBS. Fifty microliters of medium containing different concentrations of VP6 nanotubes was added to cells and incubated for 2 h. Viability was measured using an MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma-Aldrich) assay [21]. Briefly, 10 µL of an MTT stock solution diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) (5 mg/mL) was added to each well. After incubation for two additional hours at 37 °C, the plates were centrifuged at 2000g for 10 min. The culture supernatant was removed, and 50 µL of DMSO was added to the cell pellets. Once the formazan crystals were dissolved, absorbance at 595 nm was measured in a plate spectrophotometer (ELx800, Bio-Tek Instruments Inc.). Cell viability was calculated by comparing the absorbance of untreated cells (100 % viability) with the absorbance of treated cells.

THP1 and J774 cells were seeded in 96-well plates at a cell concentration of 2 × 10⁴ cells/well in RPMI supplemented with 10 % (v/v) FBS and 50 ng/mL PMA. Ninety-six hours later for THP1 cells or 48 h later for J774 cells, the medium was removed and cells were washed twice with PBS. Different concentrations of VP6 nanotubes in RPMI were added to cells and incubated for 2 h at 37°C, and viability was measured as described previously. To evaluate the cytotoxicity of the endocytosis inhibitors MβCD (Sigma) and genistein (Sigma) to THP1 and J774 cells, a similar experiment was performed where the inhibitors, diluted in RPMI, were added to cells and incubated for 2 h.

In vitro uptake of VP6 nanotubes

CaCo-2, HEK-293 and COS-7 cells were seeded at 5 × 10⁴ cells/well in 8-well chamber slides (Lab-Tek® II CC2TM Chamber Slide, Nunc) and cultured for 24 h in DMEM containing 10 % FBS (v/v). THP1 cells 10⁵ per well were seeded in 8-well chamber slides in RPMI containing 10 % FBS (v/v), and 50 ng/mL PMA was added to induce cell differentiation for 96 h.

Differentiation of J774 cells was induced by treatment with PMA for 48 h. Cells were washed twice with PBS, VP6 nanotubes resuspended in serum-free medium at a concentration of 150 µg/mL were added, and cells were incubated at 37 °C. As controls, uptake of denatured VP6 or dIRLP was also tested. VP6 was denatured by heating at 90 °C for 20 min in the presence of 0.5 % SDS and then diafiltered in RPMI culture medium. After 4 h, medium was removed and cells were washed twice with cold PBS, fixed with 4 % formaldehyde in PBS (v/v) for 20 min and permeabilized with 0.2 % sodium deoxycholate and 2 % bovine serum albumin (BSA) (m/v) in PBS. After washing with PBS, cells were incubated with the monoclonal antibody (MAb) 255/60, which is specific for a conformational epitope in VP6 trimers [22], followed by a secondary antibody, a goat anti-mouse polyclonal antibody coupled to Alexa Fluor 594 (Invitrogen). The actin cytoskeleton was stained with phalloidin coupled to Alexa Fluor 488 (Invitrogen), and the cell nuclei were stained with SlowFade® Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen). To assess the uptake of dIRLP, no staining was used, as VP2 is fused to GFP and can be visualized directly due to its green fluorescence [23]. Samples were observed using a Zeiss Axio Observer microscope fitted with an ApoTome module for generation of optical slice images (Carl Zeiss, Jena, Germany) using 20× Plan-Neofluar and 40× Plan-Neofluar objectives. All images were captured using the same exposure time for each fluorophore. Image processing was performed using the Axio Vision Rel 4.8 software (Carl Zeiss). Alternatively, a confocal Olympus FV1000 microscope was used to visualize cells, and image processing was performed with the Fiji software [24].

Inhibition of VP6 nanotube uptake by the endocytosis inhibitors MβCD and genistein

THP1 and J774 cells were seeded in 8-well chamber slides and treated with PMA as described above. After washing with PBS, different concentrations of MβCD or genistein were added to cells, which were then incubated in serum-free RPMI at 37 °C. Two hours later, the medium was removed, the cells were washed twice with PBS, and 200 µL of VP6 nanotubes in serum-free RPMI at a concentration of 150 µg/mL was added to the wells. After 4 h at 37 °C, the medium was removed; cells were washed three times with cold PBS and treated for immunostaining with the anti-VP6 monoclonal antibody as described before. The actin cytoskeleton was stained with phalloidin coupled to Alexa Fluor 488 (Invitrogen), and the cell nuclei were visualized with SlowFade® Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen).

Results

Production and characterization of VP6 nanotubes

VP6 nanotubes were purified as described previously [19]. SDS-PAGE, dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM) were used to determine the size and characteristics of purified nanotubes. Purified VP6 had purity greater than 95 % (gel not shown). TEM images showed that VP6 nanotubes had a diameter of 75 nm, with lengths ranging from 500 nm to 2 μm (Fig. 1). Analysis by DLS showed that 87.3 % of the nanotube population had an average hydrodynamic diameter of 1073 nm, corresponding to an equivalent sphere (Fig. 2, peak 1). Two smaller populations with hydrodynamic diameters above 80 nm were also observed (peaks 2 and 3). The diameter of the VP6 trimer is 8 nm (calculated based on the structure reported in ref. 15). Therefore, the smaller populations correspond to macromolecular assemblies of VP6, and not trimers or monomers. These results are in agreement with previous reports from our group [19, 25].

Evaluation of the cytotoxicity of VP6 nanotubes

To assess the cytotoxicity of nanotubes in a wide range of tissues, cell lines of different origin were used. CaCo-2 cells were derived from colon carcinoma, HEK-293 cells were obtained from human embryonic kidney, COS-7 cells were derived from the kidney of an African green monkey, J774 is a macrophage cell line established from a sarcoma that arose in a BALB/c mouse, and THP1 cells were derived from peripheral blood of a human male with monocytic leukemia (<http://www.atcc.org>). The *in vitro* toxicity of VP6 nanotubes was evaluated by incubating them with the various cell lines for 4 h at 37 °C. Viability remained above 80 % in all the cell lines tested, even at the highest nanotube concentration (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Fig. 3).

Therefore, VP6 nanotubes were not toxic to any of the cell lines tested here.

VP6 nanotubes are internalized only by macrophages

The internalization of VP6 nanotubes by the cell lines listed above was assessed using fluorescent immunolabeling and microscopy. VP6 nanotubes were observed attached to the exterior surface of CaCo-2 and HEK-293 cells, but not of COS-7 cells (Fig. 4, upper panels). However, no evidence of the intracellular presence of VP6 was observed when various z planes were examined, indicating that VP6 was not internalized by these cells. In contrast, when THP1 or J774 cells were incubated with VP6 nanotubes for 4 h, the intracellular presence of VP6 was immunodetected in both cell lines (Fig. 4D, F). No red fluorescence (anti-VP6 antibody) was observed in control cells incubated with medium without VP6 (Fig. 4E, G). VP6 was distributed in the cytoplasm of J774 cells mainly near the plasma membrane (Fig. 4F). In THP1 cells, VP6 was preferentially located in discrete spots in the perinuclear region. For comparison, THP1 and J774 cells were incubated with denatured VP6 (Fig. 5A, B) or with dIIRLP (Fig. 5C, D) for 4 h. dIIRLP are icosahedral, have a mean diameter of 70 nm, and are formed by GFP-VP2 and VP6. Denatured VP6 was only detected in the outer membrane of both macrophage cell lines. No intracellular VP6 or dIIRLP was detected, indicating that neither denatured VP6 nor dIIRLP was taken up by cells.

The internalization of VP6 nanotubes depends on the presence of cholesterol in the plasma membrane and is not influenced by the activity of tyrosine kinases

To investigate the entry route of VP6 nanotubes, two specific endocytosis inhibitors were used: M β CD and genistein. The concentration of both inhibitors was determined based on cytotoxicity studies and was set to

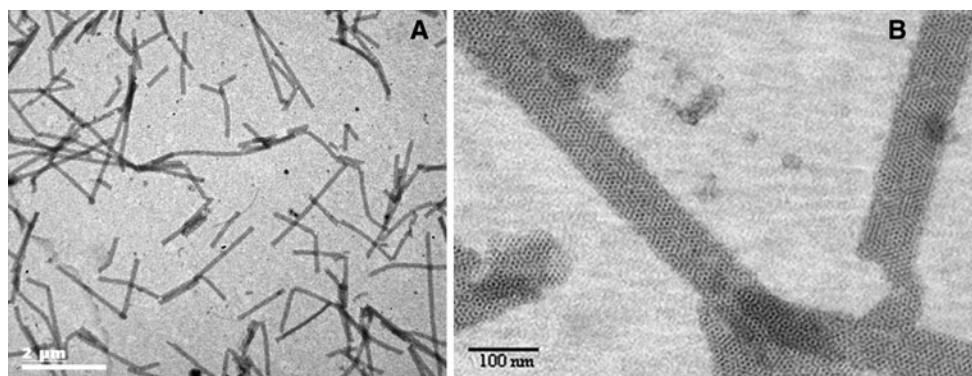


Fig. 1 Transmission electron microscopy of purified VP6 nanotubes. The sample was stained with uranyl acetate. A: Magnification of 7000 \times . B: Magnification of 100,000 \times . Scales are as indicated

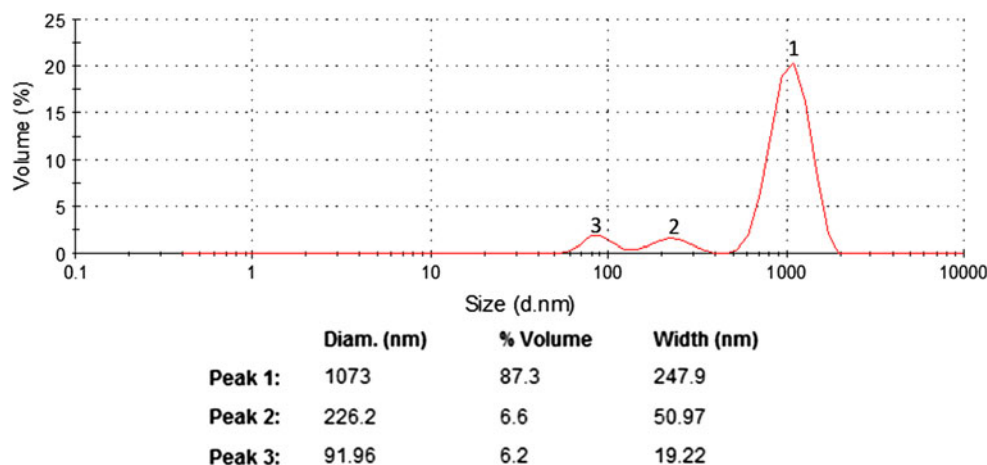


Fig. 2 Size distribution by volume of purified VP6 nanotubes as measured by dynamic light scattering. The graph shows the volume percent of each population versus their corresponding size in

nanometers, assuming a spherical particle shape. The table lists the average diameter of each population (nm)

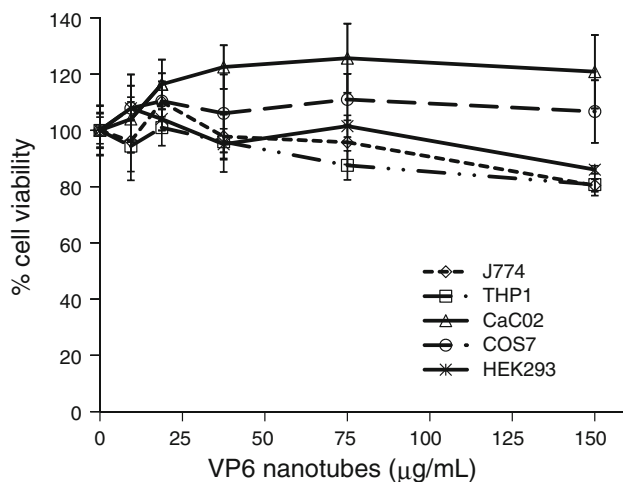


Fig. 3 Viability of CaCo-2, HEK-293, COS-7, THP1 and J774 cells incubated for 4 h with different concentrations of VP6 nanotubes diluted in serum-free medium. The percentage of cells that were viable was calculated with respect to the number of cells that were viable without treatment, defined as 100 %. Error bars indicate the standard deviation from eight replicate cultures

concentrations that did not affect the viability of THP1 or J774 cells. While no cytotoxicity was observed at the M β CD concentrations tested (0.3 to 5 mM), addition of genistein at concentrations above 200 μ M caused a significant decrease in viability of THP1 cells (data not shown). Therefore, M β CD concentrations between 0.3 and 5 mM and genistein at concentrations below 200 μ M were used for the endocytosis inhibition experiments in both cell lines.

M β CD reversibly extracts cholesterol from the plasma membrane [21]. THP1 cells were incubated for 2 h at 37 $^{\circ}$ C with a range of concentrations of M β CD (5, 2.5, 1.25, 0.625 and 0.312 mM) diluted in RPMI. VP6

nanotubes were then added to the cells and were incubated for an additional 4 h. VP6 was observed inside cells without M β CD, as well as in cells preincubated with 0.312 and 0.625 mM M β CD (Fig. 6A, B and C, respectively; Online Resource Fig. 1), whereas in cells treated with 1.25 mM to 5 mM M β CD, the VP6 signal detected inside THP1 cells decreased as the M β CD concentration increased. At the highest M β CD concentrations, VP6 was only observed outside the cells (Fig. 6E, F). Similar to this observation in THP1 cells, when J774 cells were preincubated with M β CD, the amount of VP6 inside the cells decreased as the concentration of M β CD increased (Fig. 7A to E). The addition of 5 mM M β CD to J774 cells almost completely abolished the red signal corresponding to VP6 (Fig. 7E). The green signal of the actin cytoskeleton co-localized with the red signal; therefore, the green signal of the phalloidin-Alexa 488 is shown in Online Resource Fig. 2.

When THP1 cells were incubated with 50 μ M and 100 μ M genistein (Fig. 8B and C), no reduction of the internalization of VP6 nanotubes was observed when compared with cells without the inhibitor (Fig. 8A). Nevertheless, the distribution of the actin filaments (green) changed upon treatment with genistein. They were dispersed in the cytoplasm, while in untreated THP1 cells, actin filaments were mainly located near the cell membrane. There was no reduction in the signal derived from the internalization of VP6 nanotubes when J774 cells were pretreated with 50, 100 or 200 μ M genistein (Fig. 8E, F and G). The VP6 signal was similar to that observed in mock-treated cells (Fig. 8D). For J774 cells, the distribution pattern of the actin filaments remained the same whether or not the cells were preincubated with genistein.

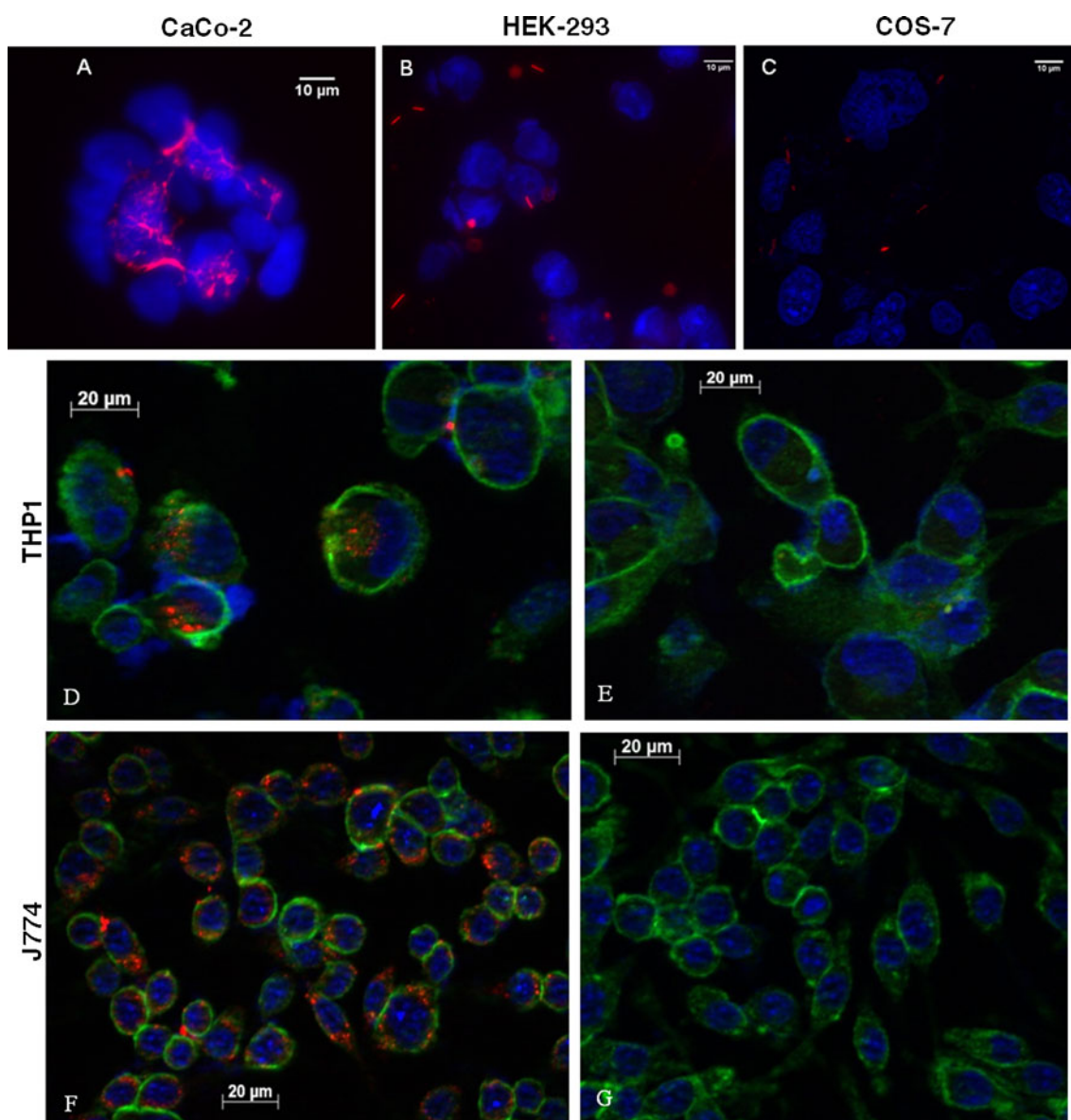


Fig. 4 Internalization of VP6 nanotubes by cells. Panels A, B and C show CaCo-2, HEK-293 and COS-7 cells, respectively. Panels D to G show THP1 or J774 macrophages. Cells in panels A, B, C, D and F were incubated for 4 h with 200 μ L of a 150 μ g/mL VP6 nanotube solution in serum-free medium. Cells from panels E and G were

incubated with serum-free medium. The presence of VP6 was detected with an anti-VP6 mouse monoclonal antibody and a goat polyclonal anti-mouse antibody coupled to Alexa 594 (red). Nuclei were stained with DAPI (blue). The actin cytoskeleton of macrophage cells (lower panels) was stained with phalloidin-Alexa 488 (green)

Discussion

VP6 nanotubes have been demonstrated to be excellent immunogens and more efficient at providing protection from rotavirus challenge than dIRLP or trimers [14]. In order to understand this property, the interaction of VP6 nanotubes with cells of different lineages (myeloid, epithelial and fibroblasts-like) was evaluated in *in vitro* cultures. First, the cytotoxicity of nanotubes to cells of various lineages was analyzed. This is of interest, as tubular structures have been reported to be toxic to cells

[26–28]. VP6 nanotubes were not toxic to any of the cell lines tested here, even when it was shown that they interact with cells.

Further experiments evaluated the ability of cells to internalize VP6 nanotubes. The mechanism involved in the specificity of the cellular uptake of polymeric particles is not well defined, but it is known to depend on the shape and surface properties of the particles. VP6 nanotubes were only internalized by cell lines of myeloid origin, indicating that nanotube uptake was specific. Control experiments with dIRLP and denatured VP6 showed that uptake was

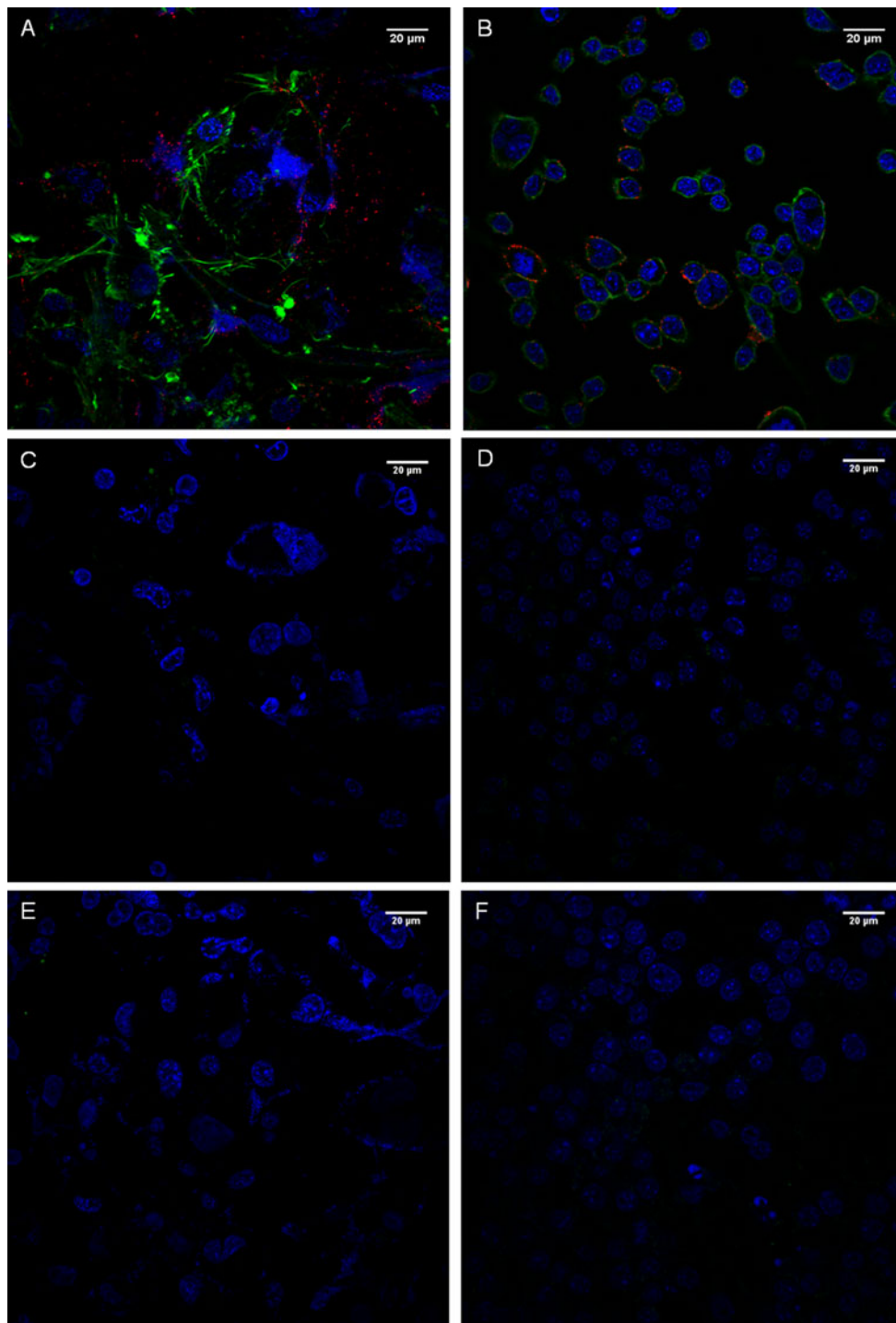


Fig. 5 Interaction of denatured VP6 or dIRLP with THP1 or J774 cells. A and B: THP1 and J774 cells, respectively, incubated with 200 μ L of a 150 μ g/mL solution of denatured VP6 for 4 h. The presence of VP6 was detected with an anti-VP6 mouse monoclonal antibody and a goat polyclonal anti-mouse antibody coupled to Alexa

594 (red), and the actin cytoskeleton was stained with phalloidin-Alexa 488 (green). C and D: THP1 and J774 cells, respectively, incubated with 150 μ g/mL of dIRLP for 4 h. dIRLP was visualized using the GFP label in VP2 (green). E and F: THP1 and J774 cells incubated with RPMI medium. Nuclei were stained with DAPI (blue)

specific to nanotubes, as neither of the other forms of VP6 was internalized by macrophage cells. This indicates that the size and shape of VP6 nanotubes are essential features that determine their specific uptake by THP1 and J774

cells. Similar results have been reported for OVA-conjugated beads of sizes ranging from 40 nm to 2 μ m [29]. It was shown that larger beads are taken up preferentially by a macrophage-like subset of antigen-presenting cells. As

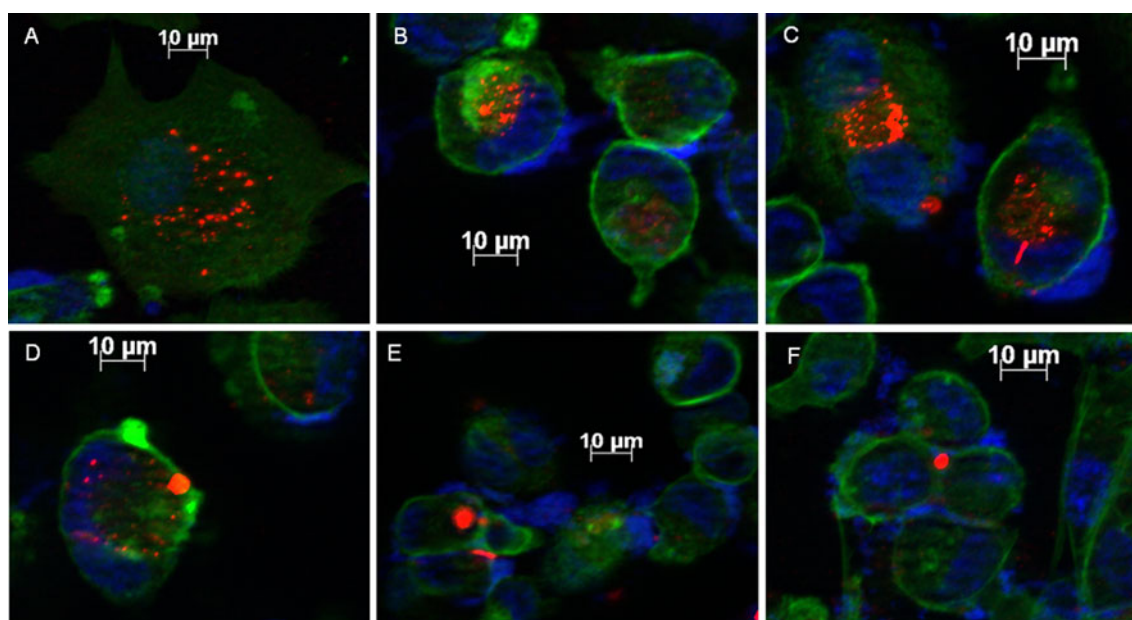


Fig. 6 Influence of M β CD on the internalization of VP6 nanotubes by THP1 cells. Cells were incubated for 2 hours with different concentrations of M β CD (A, 0; B, 0.312 mM; C, 0.625 mM; D, 1.25 mM; E, 2.5 mM; F, 5 mM) and then 200 μ L of a 150 μ g/mL solution of VP6 nanotubes was added to all wells and incubated for

another 4 h. The presence of VP6 inside cells was detected using an anti-VP6 mouse monoclonal antibody and a goat anti-mouse polyclonal antibody coupled to Alexa-594 (red). Nuclei were stained with DAPI (blue), and the actin cytoskeleton was stained with phalloidin-Alexa 488 (green)

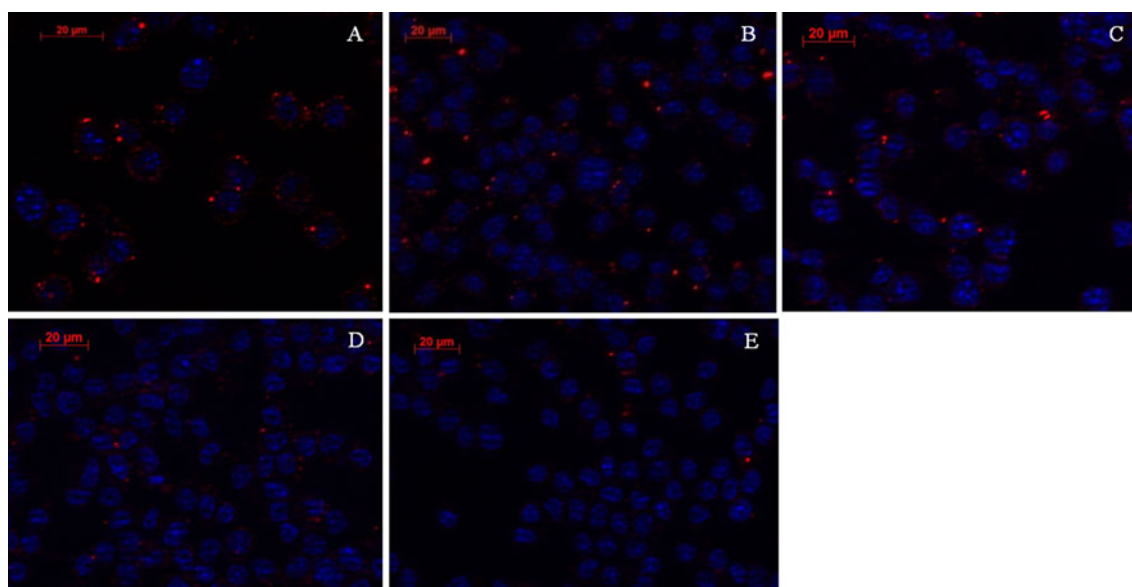


Fig. 7 Influence of M β CD on the internalization of VP6 nanotubes by J774 cells. Cells were preincubated for 2 h with different concentrations of M β CD (A, 0; B, 0.625 mM; C, 1.25 mM; D, 2.5 mM; E, 5 mM) and then 200 μ L of a 150 μ g/mL solution of VP6 nanotubes was added and incubated for another 4 h. VP6 internalized by cells was detected using fluorescence microscopy with an anti-VP6 mouse monoclonal antibody and a goat anti-mouse polyclonal

antibody coupled to Alexa-594 (red). Nuclei were stained with DAPI (blue), and the actin cytoskeleton was stained with phalloidin-Alexa 488 (green). The green signal of the actin cytoskeleton is not shown because most of the VP6 signal co-localized with it. Images of the actin cytoskeleton signal are presented in Figure 2 of the online resources file

macrophages are important immune effector and regulator cells, our results can explain why the level of serum IgG raised against VP6 is higher in CD1 mice immunized with

VP6 nanotubes than in mice immunized with dIRLP, as well as the higher protection generated against rotavirus infection measured as a reduction of viral shedding [14].

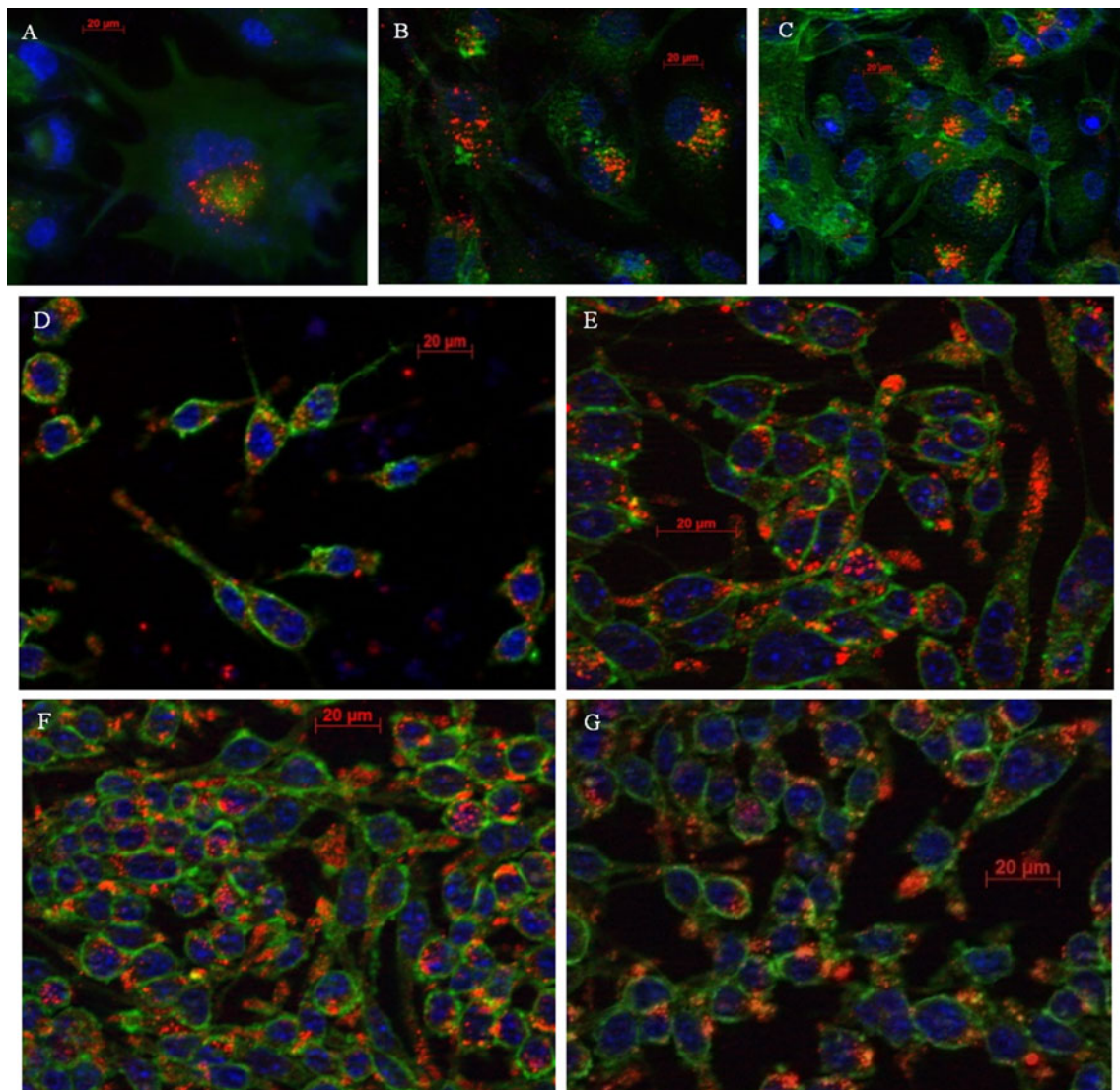


Fig. 8 Influence of genistein on the internalization of VP6 nanotubes in THP1 (panels A, B and C) and J774 (panels D, E, F and G) cells. Cells were incubated for 2 h with different concentrations of genistein (A and D, 0; B and E, 50 μM ; C and F, 100 μM ; G, 200 μM) and then 200 μL of a 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ VP6 nanotube solution was added and incubated for another 4 h. The presence of the nanotubes inside the

cells was detected using fluorescence microscopy with an anti-VP6 mouse monoclonal antibody and a goat anti-mouse polyclonal antibody coupled to Alexa-594 (red). The nuclei were stained with DAPI (blue), and the actin cytoskeleton was stained with phalloidin-Alexa 488 (green)

Macrophages, the only cell type that internalized VP6 nanotubes, are capable of phagocytosing large particles and cells, but the size of VP6 nanotubes may not be the only factor that controls their specific internalization by macrophages. The specificity of the cellular uptake of VP6 nanotubes into macrophages is possibly determined by their interaction with receptors located in the plasma membrane of the cell. The entry of particles into cells is mediated by endocytic mechanisms, and a single entity may use various uptake routes to enter cells [30]. Given the size of VP6 nanotubes, phagocytosis is probably the route for their internalization by macrophages. Gualtero et al. [31] proposed that VP6 interacts with the heat shock

cognate protein HSC70, which is involved in rotavirus entry into cells. HSC70 belongs to the HSP70 family, which plays key roles in the stimulation of the immune system. Triantafilou et al. [32] identified HSC70 and HSC90 as part of a multimeric receptor complex for bacterial lipopolysaccharides in innate immune cells. Also, HSC70 binds specifically to the surface of antigen-presenting cells and is spontaneously internalized by receptor-mediated endocytosis, allowing the cross-presentation of peptide antigens [33]. Members of the HSP70 family are located within lipid rafts in the plasma membrane of cells [34], and interaction with them may be disrupted by a decrease of cholesterol in the membrane, as observed here

when M β CD was used. Whether HSC70 protein is involved in the interaction of VP6 nanotubes with macrophages remains to be determined.

The two specific inhibitors tested here interfere with two different endocytic mechanisms. Cholesterol, extracted by M β CD, has pivotal roles in phagocytosis along with other components of the cellular membrane [35–37]. That M β CD inhibited entry of VP6 nanotubes into macrophages indicates that the presence of cholesterol in the plasma membrane of THP1 and J774 macrophages, and probably the grouping of certain receptors within lipid rafts, is required. In agreement with our results, Nagao and coworkers [38] reported that the addition of M β CD impaired the incorporation of polystyrene latex microspheres (3 μ m diameter) into J774 cells, indicating that microspheres were incorporated via lipid-raft-dependent phagocytosis. The influence of membrane cholesterol on the phagocytic capacity of J774 macrophages was also demonstrated by Gatfield and Peters [39]. Depletion of plasma membrane cholesterol resulted in a 85 to 90 % reduction of the uptake of *Mycobacterium bovis* BCG by J774 cells.

Although the inhibitory activity of the tyrosine kinase inhibitor genistein on endocytosis has not been fully characterized, it is proposed that it impairs the recruitment of dynamin II to the endocytosis site, which participates in the scission of the endocytic vesicles in clathrin-dependent and caveolae-dependent endocytosis [21]. It is possible that the size of VP6 nanotubes impaired their internalization by clathrin-coated vesicles (200 nm in size) or by caveolae (50–80 nm). Moreover, J774 cells do not express caveolin [40]. Therefore, it is not surprising that genistein did not affect VP6 nanotube uptake. The disperse state of the actin filaments observed in the cytoplasm of genistein-treated THP1 cells was probably due to a local disruption of the actin cytoskeleton. The addition of genistein disrupted the actin cytoskeleton in THP1 but not in J774 macrophages. The observation that VP6 nanotubes only entered macrophages and that the entry did not occur through clathrin-coated vesicles or through caveolae suggest that the tubular form of VP6 was taken up by macrophages.

This work contributes to our understanding of the high immunogenicity of VP6 nanotubes by providing information about their interaction with cells in culture. Our results suggest that the size of the immunogen and the spatial distribution of epitopes are relevant for the stimulation of antigen-presenting cells, as only VP6 nanotubes, and not dRLP or denatured VP6, were taken up by macrophages.

Acknowledgements Financial support was provided by SEP-Conacyt 101847 and PAPIIT-UNAM IN223210 and IT200113. MR received financial support from Conacyt during her graduate studies. Technical support was provided by A. R. Pastor and V. Hernández and by G. Zavala and A. N. Lecona at the Electron Microscopy Units

of Instituto de Biotecnología UNAM and Instituto Nacional de Salud Pública, Mexico, and J. A. Pimentel at the Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada UNAM, México. Materials were provided by Dr. Y. Rosenstein, Dr. A. Valdez, and Dr. C. Treviño.

Conflict of interest The authors declare that they do not have any direct financial relationship with the commercial entities mentioned in this manuscript.

References

1. Wardlaw T, Salama P, Brocklehurst C, Chopra M, Mason E (2010) Diarrhoea: why children are still dying and what can be done. *Lancet* 375(9718):870–872. doi:10.1016/S0140-6736(09)61798-0
2. Rotavirus vaccines WHO position paper: January 2013—Recommendations (2013). *Vaccine*. doi:10.1016/j.vaccine.2013.05.037
3. Ward RL, McNeal MM, Steele AD (2008) Why does the world need another rotavirus vaccine? *Ther Clin Risk Manag* 4(1):49–63
4. Esquivel FR, Lopez S, Guitierrez XL, Arias C (2000) The internal rotavirus protein VP6 primes for an enhanced neutralizing antibody response. *Arch Virol* 145(4):813–825
5. Banos DM, Lopez S, Arias CF, Esquivel FR (1997) Identification of a T-helper cell epitope on the rotavirus VP6 protein. *J Virol* 71(1):419–426
6. Ward RL, McNeal MM (2010) VP6: a candidate rotavirus vaccine. *J Infect Dis* 202(Suppl):S101–S107. doi:10.1086/653556
7. Schwartz-Cornil I, Benureau Y, Greenberg H, Hendrickson BA, Cohen J (2002) Heterologous protection induced by the inner capsid proteins of rotavirus requires transcytosis of mucosal immunoglobulins. *J Virol* 76(16):8110–8117
8. Corthesy B, Benureau Y, Perrier C, Fourgeux C, Parez N, Greenberg H, Schwartz-Cornil I (2006) Rotavirus anti-VP6 secretory immunoglobulin A contributes to protection via intracellular neutralization but not via immune exclusion. *J Virol* 80(21):10692–10699. doi:10.1128/JVI.00927-06
9. McNeal MM, VanCott JL, Choi AH, Basu M, Flint JA, Stone SC, Clements JD, Ward RL (2002) CD4 T cells are the only lymphocytes needed to protect mice against rotavirus shedding after intranasal immunization with a chimeric VP6 protein and the adjuvant LT(R192G). *J Virol* 76(2):560–568
10. Smiley KL, McNeal MM, Basu M, Choi AH, Clements JD, Ward RL (2007) Association of gamma interferon and interleukin-17 production in intestinal CD4+ T cells with protection against rotavirus shedding in mice intranasally immunized with VP6 and the adjuvant LT(R192G). *J Virol* 81(8):3740–3748. doi:10.1128/JVI.01877-06
11. Lepault J, Petitpas I, Erk I, Navaza J, Bigot D, Dona M, Vachette P, Cohen J, Rey FA (2001) Structural polymorphism of the major capsid protein of rotavirus. *Embo J* 20(7):1498–1507. doi:10.1093/emboj/20.7.1498
12. Ready KFM, Sabara M (1987) In vitro assembly of bovine rotavirus nucleocapsid protein. *Virology* 157(1):189–198
13. Blazevic V, Lappalainen S, Nurminen K, Huhti L, Vesikari T (2011) Norovirus VLPs and rotavirus VP6 protein as combined vaccine for childhood gastroenteritis. *Vaccine* 29(45):8126–8133. doi:10.1016/j.vaccine.2011.08.026
14. Pastor-Flores AR, Rodríguez-Limas WA, Contreras MA, Esquivel-Soto E, Esquivel-Guadarrama F, Ramírez OT, Palomares LA (2013) The assembly conformation of rotavirus VP6 determines

- its protective efficacy against rotavirus challenge in mice. *Vaccine* (in press)
15. Ghosh MK, Borca MV, Roy P (2002) Virus-derived tubular structure displaying foreign sequences on the surface elicit CD4+ Th cell and protective humoral responses. *Virology* 302(2):383–392 (pii:S004268220291648X)
 16. Mathieu M, Petitpas I, Navaza J, Lepault J, Kohli E, Pothier P, Prasad BV, Cohen J, Rey FA (2001) Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion. *Embo J* 20(7):1485–1497. doi:10.1093/emboj/20.7.1485
 17. Geng Y, Dalhaimer P, Cai S, Tsai R, Tewari M, Minko T, Discher DE (2007) Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery. *Nat Nanotechnol* 2(4):249–255. doi:10.1038/nnano.2007.70
 18. Mosser DM, Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8(12):958–969. doi:10.1038/nri2448
 19. Plascencia-Villa G, Mena JA, Castro-Acosta RM, Fabian JC, Ramirez OT, Palomares LA (2011) Strategies for the purification and characterization of protein scaffolds for the production of hybrid nanobiomaterials. *J Chromatogr B* 879(15–16):1105–1111. doi:10.1016/j.jchromb.2011.03.027
 20. Castro-Acosta RM, Revilla AL, Ramirez OT, Palomares LA (2010) Separation and quantification of double- and triple-layered rotavirus-like particles by CZE. *Electrophoresis* 31(8):1376–1381. doi:10.1002/elps.200900558
 21. Vercauteren D, Vandenbroucke RE, Jones AT, Rejman J, Demeester J, De Smedt SC, Sanders NN, Braeckmans K (2010) The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: optimization and pitfalls. *Mol Ther* 18(3):561–569. doi:10.1038/Mt.2009.281
 22. Greenberg HB, Valdesuso J, Vanwyke K, Midthun K, Walsh M, McAuliffe V, Wyatt RG, Kalica AR, Flores J, Hoshino Y (1983) Production and preliminary characterization of monoclonal-antibodies directed at 2 surface-proteins of rhesus rotavirus. *J Virol* 47(2):267–275
 23. Mena JA, Ramirez OT, Palomares LA (2006) Intracellular distribution of rotavirus structural proteins and virus-like particles expressed in the insect cell-baculovirus system. *J Biotechnol* 122(4):443–452. doi:10.1016/j.jbiotec.2005.10.005
 24. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9(7):676–682. doi:10.1038/nmeth.2019
 25. Plascencia-Villa G, Saniger JM, Ascencio JA, Palomares LA, Ramirez OT (2009) Use of recombinant rotavirus VP6 nanotubes as a multifunctional template for the synthesis of nanobiomaterials functionalized with metals. *Biotechnol Bioeng* 104(5):871–881. doi:10.1002/bit.22497
 26. Mrakovcic M, Absenger M, Riedl R, Smole C, Roblegg E, Frohlich LF, Frohlich E (2013) Assessment of long-term effects of nanoparticles in a microcarrier cell culture system. *Plos One* 8(2):e56791. doi:10.1371/journal.pone.0056791
 27. Kagan BL, Jang H, Capone R, Teran Arce F, Ramachandran S, Lal R, Nussinov R (2012) Antimicrobial properties of amyloid peptides. *Mol Pharm* 9(4):708–717. doi:10.1021/mp200419b
 28. Harrison RS, Sharpe PC, Singh Y, Fairlie DP (2007) Amyloid peptides and proteins in review. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 159:1–77. doi:10.1007/112_2007_0701
 29. Fifis T, Gamvrellis A, Crimeen-Irwin B, Pietersz GA, Li J, Mottram PL, McKenzie IF, Plebanski M (2004) Size-dependent immunogenicity: therapeutic and protective properties of nanovaccines against tumors. *J Immunol* 173(5):3148–3154 (pii:173/5/3148)
 30. Jones AT (2008) Gateways and tools for drug delivery: endocytic pathways and the cellular dynamics of cell penetrating peptides. *Int J Pharm* 354(1–2):34–38. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.10.046
 31. Gualtero DF, Guzman F, Acosta O, Guerrero CA (2007) Amino acid domains 280–297 of VP6 and 531–554 of VP4 are implicated in heat shock cognate protein hsc70-mediated rotavirus infection. *Arch Virol* 152(12):2183–2196. doi:10.1007/s00705-007-1055-5
 32. Triantafilou K, Triantafilou M, Dedrick RL (2001) A CD14-independent LPS receptor cluster. *Nat Immunol* 2(4):338–345. doi:10.1038/86342
 33. Arnold-Schild D, Hanau D, Spehner D, Schmid C, Rammensee HG, de la Salle H, Schild H (1999) Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. *J Immunol* 162(7):3757–3760
 34. Foster LJ, De Hoog CL, Mann M (2003) Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(10):5813–5818. doi:10.1073/pnas.0631608100
 35. Yeung T, Grinstein S (2007) Lipid signaling and the modulation of surface charge during phagocytosis. *Immunol Rev* 219:17–36
 36. Botelho RJ, Teruel M, Dierckman R, Anderson R, Wells A, York JD, Meyer T, Grinstein S (2000) Localized biphasic changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis. *J Cell Biol* 151(7):1353–1367
 37. Falkenburger BH, Jensen JB, Dickson EJ, Suh BC, Hille B (2010) Phosphoinositides: lipid regulators of membrane proteins. *J Physiol London* 588(17):3179–3185. doi:10.1113/jphysiol.2010.192153
 38. Nagao G, Ishii K, Hirota K, Makino K, Terada H (2010) Role of lipid rafts in phagocytic uptake of polystyrene latex microspheres by macrophages. *Anticancer Res* 30(8):3167–3176
 39. Gatfield J, Pieters J (2000) Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science* 288(5471):1647–1650
 40. Fra AM, Williamson E, Simons K, Parton RG (1995) De-novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of Vp21-caveolin. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(19):8655–8659