



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

### CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PARTÍCULAS TIPO VIRUS MULTIFUNCIONALES DE PARVOVIRUS B19

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
CARLA LIZBETH SEGOVIA TRINIDAD

TUTOR PRINCIPAL  
Dr. ISMAEL BUSTOS JAIMES  
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dra. Adela Rodríguez Romero  
Departamento de Biomacromoléculas, Instituto de Química  
Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera  
Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología  
Dr. Ismael Bustos Jaimes  
Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina

Ciudad de México. Marzo, 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Jurado asignado:**

PRESIDENTE	Costas Basín Miguel Antonio
VOCAL	Fernández Velasco Daniel Alejandro
VOCAL	Gonzáles Segura Lilian
VOCAL	Hernández García Armando
SECRETARIO	Sánchez Puig Nuria Victoria

Este trabajo contó con recursos del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT, Proyecto IN200316).

Durante el desarrollo de este proyecto se me otorgó la beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) para apoyo a estudios de maestría.

Se realizó una estancia de investigación en el Instituto Tecnológico de Karlsruhe en Karlsruhe, Alemania, gracias a la beca otorgada por el Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP-UNAM) y a la beca mixta concedida por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

## Agradecimientos

A mis padres por su apoyo incondicional. Mamá, gracias por haber decidido invertir tu tiempo en mi cuidado cuando era pequeña, por alentar mi educación y por estar ahí siempre para mí.

Papá, te admiro mucho papá. Te agradezco todo lo que has trabajado para brindarnos siempre lo mejor y por tratarnos como tus tesoros.

A mi compañero de vida, Mauricio. Por tu apoyo durante la carrera, por tu paciencia y cariño.

A mi universidad, ¡por brindarme todo!. Por la alta calidad educativa a la que me permitió aspirar, por brindarme el apoyo económico para realizar estancias internacionales y por haberme permitido cumplir mi sueño de hacer investigación.

A mi tutor, Ismael Bustos. Gracias por haberme dado el privilegio de apoyarte en tu investigación, por tu paciencia, tu guía y apoyo en aplicación al DAAD.

Al Dr. Luis Olguín, por haberse tomado el tiempo de explicarme qué eran aquellos “churritos y listones” hechos de aminoácidos en aquel laboratorio de cinética de segundo semestre de licenciatura. Dicho evento eventualmente me llevaría a mi inclinación por la Bioquímica. Gracias por recibir a una ingeniera en su laboratorio y con ello darme la bienvenida al mundo de las proteínas.

To Dr. Jürgen Hubbuch, for kindly hosting me in your lab. Philipp, thanks for your guide and fellowship.

A mis compañeros de laboratorio, por sus consejos y compañía en esos largos días de trabajo. A Hugo Santillán, por escucharme y ayudarme en todo lo que se presentó, sólo puedo decirte que ¡eso sí es de “compas”!. Sergio Aguirre, tus consejos fueron decisivos durante mi trabajo de subclonación. Josefina, gracias por las microscopías de fuerza atómica. A Laura Alvarez, por tenernos siempre y sin falta nuestros geles de poliacrilamida.

# Contenido

ABREVIATURAS USADAS .....	1
ABSTRACT .....	2
1. ANTECEDENTES.....	2
1.1 LAS PARTÍCULAS TIPO VIRUS COMO APLICACIONES DE LA NANOTECNOLOGÍA .....	2
1.1.1 Aplicaciones biotecnológicas de las VLPs .....	3
1.1.2 Sistemas de expresión para la generación de VLPs.....	3
1.2 ERITROPARVOVIRUS I DE PRIMATE .....	4
1.2.1 Características generales.....	4
1.2.2 Manifestaciones clínicas, infección y respuesta inmune .....	5
1.2.3 Estructura.....	6
1.2.4 Genoma y diversidad genética.....	7
1.3 ANTECEDENTES SOBRESALIENTES DEL PARVOVIRUS B19 COMO PARTÍCULA TIPO VIRUS ...	7
1.4 PROTEÍNAS DE FUSIÓN .....	9
1.4.1 Lipasa A de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1 (BpIA) .....	9
1.4.2 Proteína verde fluorescente (GFP) de <i>Aequorea victoria</i> .....	11
1.4.3 Isomaltasa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	14
1.4.4 Dihidrofolato reductasa humana (DHFR) .....	16
2. JUSTIFICACIÓN .....	18
3. HIPÓTESIS.....	19
4. OBJETIVOS.....	19
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
5.1 DISEÑO DE SECUENCIAS .....	21
5.2 SUBCLONACIÓN DE SECUENCIAS .....	22
5.3 EXPRESIÓN DE VP2 Y PROTEÍNAS QUIMÉRICAS .....	22
5.4 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR COLUMNA DE AFINIDAD DE NÍQUEL .....	23
5.4.1 Lisis celular y limpieza de cuerpos de inclusión .....	23
5.4.2 Purificación de proteína .....	24
5.5 ENSAMBLE <i>IN VITRO</i> DE LAS VLPs.....	25
5.6 AISLAMIENTO DE VLPs MULTIFUNCIONALES POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD.....	26
5.6.1 Replegamiento del dominio de afinidad glutation-s-transferasa de Q <sub>GFP</sub> .....	27
5.7 CARACTERIZACIÓN DE LAS VLPs .....	28

5.7.1 Aislamiento de VLPs por cromatografía de exclusión molecular .....	28
5.7.2 Determinación de tamaño de partícula por dispersión dinámica de luz (DLS) .....	28
5.7.3 Aislamiento de VLPs por gradientes de cloruro de cesio .....	29
5.7.4 Caracterización de VLPs por microscopía de fuerza atómica (AFM) .....	29
5.7.5 Caracterización de VLPs por microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	29
5.7.6 Medición de actividad/fluorescencia de las VLPs .....	30
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
6.1 DISEÑO DE SECUENCIAS .....	32
6.2 SUBCLONACIÓN DE SECUENCIAS .....	35
6.3 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS Y VP2 .....	37
6.4 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR COLUMNA DE AFINIDAD DE NÍQUEL .....	39
6.5 AISLAMIENTO DE VLPs MULTIFUNCIONALES POR CROMATOGRFÍA DE AFINIDAD.....	40
6.5.1 Replegamiento del dominio de afinidad glutation-s-transferasa de Q <sub>GFP</sub> .....	42
6.6 CARACTERIZACIÓN DE LAS VLPs .....	44
6.6.1 Aislamiento de VLPs por cromatografía de exclusión molecular .....	44
6.6.2 Determinación de tamaño de partícula por dispersión dinámica de luz (DLS) .....	45
6.6.2 Purificación de VLPs por gradientes de cloruro de cesio .....	47
6.6.4 Caracterización de VLPs por microscopía de fuerza atómica (AFM) .....	52
6.6.5 Caracterización de VLPs por microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	53
6.6.6 Medición de actividad/fluorescencia de las VLPs .....	54
<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	<b>57</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	<b>62</b>
<b>9. EXPECTATIVAS</b> .....	<b>63</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>64</b>

## ABREVIATURAS USADAS

4-NP/pNP	4-Nitrofenol/ <i>p</i> -Nitrofenol
4-NPA/pNPA	4-Nitrofenil acetato/ <i>p</i> -Nitrofenil acetato
Absx	Absorbancia a una longitud de onda x
AFM	Microscopía de fuerza atómica
ARG	L-Arginina
B19V	Parvovirus B19
BpIA	Lipasa A de <i>Bacillus pumilus</i>
BSA	Albúmina sérica bovina
DHF	Ácido dihidrofólico
DLS	Dispersión dinámica de luz
eGFP	Proteína Verde Fluorescente mejorada (del inglés, "enhanced")
GFP	Proteína verde fluorescente
GLU	Enzima $\alpha$ -glucosidasa (general)
GuHCl	Cloruro de guanidinio
HBoV	Bocavirus
hDHFR	Enzima dihidrofolato reductasa humana
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
LIP	Enzima lipasa (general)
LipA	Lipasa A de <i>Bacillus subtilis</i> (LipA)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
PARV4	Parvovirus 4
PBS	Solución amortiguadora fosfatos-salina
pNPG	4-Nitrofenil- $\alpha$ -glucopiranosido
Q <sub>DHFR</sub>	Quimera dihidrofolato reductasa. Ver secuencia en la sección 5.1
Q <sub>GFP</sub>	Quimera proteína verde fluorescente. Ver secuencia en la sección 5.1
Q <sub>GLU</sub>	Quimera alfa glucosidasa. Ver secuencia en la sección 5.1
Q <sub>LIP</sub>	Quimera lipasa. Ver secuencia en la sección 5.1
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
sfGFP	Proteína Verde Fluorescente con superplegamiento (del inglés, "superfolder")
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
THF	Tetrahidrofolato
U	Unidades de actividad enzimática ( $\mu$ mol de producto generado por minuto)
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VLPs	Partículas Tipo Virus
VP1	Proteína viral 1
VP1u	Región Única de VP1
VP2	Proteína viral 2
VSR	Virus sincicial respiratorio

## ABSTRACT

Virus like particles (VLPs) are structures formed by the structural components of virions except for the genetic material. VLPs mimic the natural structure of virions and retain most of their desirable characteristics, but they are not infective. They are promising candidates for virus assembly studies and biotechnological applications such as vaccines, auto-supported catalyst and delivery tools.

In this project, recombinant VLPs of the B19 Human Parvovirus (B19V) were assembled *in vitro*. By using genetic engineering, chimeric sequences based in the core protein VP2 (His-tagged) were obtained. The attached enzymes were  $\alpha$ -glucosidase (+Strep-tagged, Q<sub>GLU</sub>) from *Saccharomyces cerevisiae*, Human Dihydrofolate Reductase (+Maltose-binding protein-tagged, Q<sub>DHFR</sub>), Green Fluorescent Protein (Glutathione S-transferase-tagged, Q<sub>GFP</sub>) and lipase A (calmodulin-binding peptide-tagged, Q<sub>LIP</sub>) from *Bacillus pumilus*.

Each chimeric protein was produced independently using *E. coli* strains and purified (also independently) via Ni<sup>2+</sup>-affinity chromatography under denaturing conditions. *In vitro* assembly of VLPs was carried out by dialysis. The particles composed of different proteins were obtained by dialyzing a mixture of the desired proteins. The resulting VLPs were purified by affinity chromatography by using their respective tag (according to the chimeric enzymes used to build the capsid). With this procedure, it is ensured that each VLP in the sample includes the desired chimeric protein. Multifunctional VLPs were characterized by size exclusion chromatography (SEC), isopycnic centrifugation (CsCl gradients), Dynamic Light Scattering (DLS), atomic force microscopy (AFM) and transmission electron microscopy (TEM). They were also kinetically characterized by spectrophotometry and by fluorescence.

Multifunctional VLPs composed by VP2, Q<sub>LIP</sub> and Q<sub>GFP</sub> were obtained. This is an important approach to develop complex systems which is on track to be used as an enzymatic replacement treatment for lysosomal diseases

## RESUMEN

Las partículas tipo virus (VLPs) son estructuras que están formadas por los componentes estructurales de los viriones excepto por su material genético. Las VLPs imitan la estructura natural de los viriones y retienen muchas de sus características deseables, sin ser infectivas. Son candidatos prometedores para estudios del ensamble de virus, así como para aplicaciones biotecnológicas como vacunas, catalizadores auto soportados y acarreadores.

En este proyecto, se ensamblaron *in vitro* VLPs recombinantes basadas en el Parvovirus Humano B19 (B19V) en condiciones. Utilizando ingeniería genética se obtuvieron secuencias quiméricas de la proteína VP2 de la cápside. A cada una de las secuencias se le añadió una etiqueta de afinidad de seis histidinas y además un dominio de afinidad distintivo (único). Las enzimas y dominios incorporados fueron la  $\alpha$ -glucosidasa (+ etiqueta Strep,  $Q_{GLU}$ ) de *S. cerevisiae*, dihidrofolato reductasa humana (+ proteína de unión a maltosa,  $Q_{DHFR}$ ), proteína verde fluorescente mejorada (+ glutatión-S-transferasa,  $Q_{GFP}$ ) y lipasa A (+ péptido de unión a calmodulina,  $Q_{LIP}$ ) de *B. pumilus*.

Cada proteína quimérica fue producida independientemente usando células de *E.coli* y posteriormente purificadas por cromatografía de afinidad a  $Ni^{2+}$  bajo condiciones desnaturizantes. Las VLPs fueron ensambladas *in vitro* por diálisis. Las partículas fueron obtenidas mediante la diálisis de las proteínas previamente purificadas por cromatografía de afinidad usando su dominio de afinidad distintivo (de acuerdo con las proteínas elegidas para construir la cápside). Con este procedimiento, se asegura que cada partícula en la muestra incorpore a la proteína quimérica deseada. Las ahora llamadas partículas multifuncionales fueron caracterizadas por cromatografía de exclusión molecular (SEC), centrifugación isopícnica (gradientes de CsCl), dispersión dinámica de luz (DLS), microscopía de fuerza atómica (AFM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Finalmente, se obtuvieron partículas bifuncionales conformadas por VP2, QLIP y QGFP. Esta es una aproximación importante para el desarrollo de sistemas complejos que pueden ser utilizados como terapia de reemplazo enzimático para el tratamiento de enfermedades lisosomales.

# 1. ANTECEDENTES

## 1.1 LAS PARTÍCULAS TIPO VIRUS COMO APLICACIONES DE LA NANOTECNOLOGÍA

La nanotecnología es una ciencia multidisciplinaria que involucra la creación y utilización de materiales, equipos y sistemas a escala nanométrica (Bagchi et al., 2013). Existe una marcada tendencia global hacia el estudio, desarrollo y aplicación de la nanotecnología. De alguna u otra forma, todo lo que nos rodea es resultado de aplicaciones biotecnológicas. Por citar algunos ejemplos, los catalizadores se distinguen por su alta área superficial producto del tamaño nanoscópico de sus poros (Bowker, 1998) y son vitales para la industria química; son pocas las reacciones de interés que no necesitan de un catalizador para llevarse a cabo en tiempos factibles. Los nanotubos de carbono confieren a los materiales alta resistencia mecánica y térmica, además de ser buenos conductores de electricidad, lo que permite utilizarlos en electrónica y robótica, entre otros. Las nanopartículas exhiben propiedades fisicoquímicas y biológicas amigables con el cuerpo humano por lo que la nanomedicina ha tenido importantes contribuciones al área de la salud como por ejemplo en el desarrollo de biomateriales, biosensores, productos para imagenología, diagnóstico, terapia génica, entrega eficiente de fármacos o incluso tratamientos contra el cáncer. Se han desarrollado, por ejemplo, nanopartículas magnetoeléctricas (30-nm CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> @ BaTiO<sub>3</sub>) que son capaces de distinguir células sanas de células cancerígenas en ensayos *in vitro* e *in vivo* y liberar fármacos unidos a su superficie (paclitaxel) de manera selectiva (Rodzinski et al., 2016).

Una de las aplicaciones biotecnológicas aparentemente inverosímiles se encuentra en entidades que históricamente han sido vistos como enemigos del hombre: **los virus**. Y cómo no entenderlo si éstos han sido los causantes de padecimientos como la rabia, la varicela, el sarampión, la poliomelitis o la viruela. Y ni qué decir de los efectos devastadores de virus los actuales como el VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), de la influenza o del ébola. A pesar de todo lo terrible que pueden ser, son precisamente las características distintivas de los virus como su alta afinidad por cierto(s) tejido(s) específico(s) (tropismo) (McCall et al., 2016), su capacidad de auto ensamble o su resaltable nivel de organización estructural lo que los hace candidatos efectivos para aplicaciones biotecnológicas. Mediante el uso de ingeniería genética y sistemas de expresión heteróloga, es posible obtener partículas virales que carecen de su material genético, a los cuales se les llaman partículas tipo virus (Chroboczek et al., 2014) (VLPs, del inglés *virus-like particles*).

Las partículas tipo virus están compuestas por una o más proteínas virales que se autoensamblan de manera espontánea para formar estructuras que imitan al virus en el que están basados. Al no contar con material genético viral, las VLPs no son infectivas (Dan Yang et al., 2015) y por ello ha mostrado ser candidatos adecuados para una gran diversidad de aplicaciones biotecnológicas. Con el uso de química básica, ingeniería genética y sistemas heterólogos de expresión, es posible obtener partículas tipo virus modificadas a conveniencia con un número ilimitado de posibilidades.

### 1.1.1 Aplicaciones biotecnológicas de las VLPs

El tamaño nanométrico, la estabilidad y la biocompatibilidad natural de las VLPs, las han convertido en candidatos prometedores para aplicaciones biotecnológicas. Al imitar la organización y conformación nativa de los virus, las VLPs suelen conservar las propiedades inmunogénicas de los viriones nativos, lo cual ha permitido utilizarlas como **vacunas** al inducir la producción de anticuerpos específicos contra ellos (Fuenmayor et al., 2017). Las VLPs también conservan las propiedades de reconocimiento molecular que les imparten tropismo, por lo que pueden ser utilizados como **vectores/acarreadores** altamente especializados de moléculas de importancia biológica como medicamentos, microRNAs, siRNAs, mRNA, genes (terapia génica), péptidos anticuerpos, entre otros (Shirbaghaee et al., 2015). Dichas moléculas pueden ser transportados tanto en el interior (encapsulamiento, modificación genética o química) como en el exterior de la partícula (modificación genética o química). Por otro lado, las VLPs pueden ser utilizadas como **subrogantes** para el estudio de las propiedades biológicas de los virus (Yang et al., 2015), lo cual es especialmente útil para virus altamente infecciosos como los del Ébola o Marburg.

Las propiedades de las partículas tipo virus pueden ser modificadas, o bien potenciadas, mediante su modificación química o genética. Las VLPs presentan una alta área superficial (tanto interior como exterior) que expone grupos reactivos de lisina, cisteína o tirosina que permiten conjugar químicamente moléculas de interés. Además, al ser estructuras altamente ordenadas y simétricas, las VLPs han sido utilizados como **catalizadores autoportados** que despliegan enzimas de interés biomédico (Sánchez-Rodríguez et al., 2010).

### 1.1.2 Sistemas de expresión para la generación de VLPs

Para la producción de las VLPs se han utilizado diversos sistemas de expresión heterólogos bacterianos y eucarióticos. Los sistemas bacterianos como *Escherichia coli* y *Pseudomonas* sp. son utilizados ampliamente debido al bajo costo de producción, relativa sencillez de las técnicas y

medios de cultivo, así como por la alta sobreexpresión de proteína que se obtiene (Murthy et al., 2015; Waty et al., 2017). Sin embargo, en estos sistemas no es posible llevar a cabo modificaciones postraduccionales, formación de puentes disulfuro correctos y la proteína puede llegar a almacenarse de manera insoluble. Por otro lado, también existen sistemas eucarióticos como son células de insecto (sistema que utiliza baculovirus), levadura (*Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Hansenula polymorpha*), y líneas celulares de mamífero y de plantas que permiten obtener VLPs solubles con las modificaciones postraduccionales/envoltura requeridas. En general, los sistemas de expresión eucarióticos suelen ser más complejos, costosos y el rendimiento de proteína obtenida disminuye considerablemente (Shirbaghaee et al., 2015; Fuenmayor et al., 2017). La elección de un sistema adecuado para la generación de VLPs es un paso importante para la obtención de partículas con las características deseadas.

## 1.2 ERITROPARVOVIRUS I DE PRIMATE

### 1.2.1 Características generales.

El parvovirus B19 (B19V), cuyo nombre cambió recientemente a "Eritroparvovirus 1 de primate" (ICTV, 2014), es un virus icosaédrico pequeño, no envuelto, cuyo tamaño oscila entre los 18 y los 26 nm (Sánchez-Rodríguez et al., 2012) (Figura 1a). Pertenece a la familia *Parvoviridae* (Figura 1b) dentro de la cual el parvovirus 4 (PARV4), el Bocavirus (HBoV) y el parvovirus B19 son los únicos virus conocidos hasta el momento que son capaces de infectar humanos (Servant-Delmas et al., 2016).

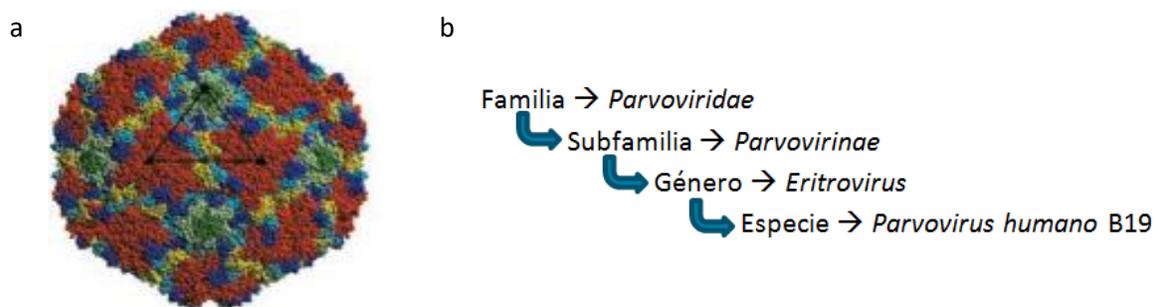


Figura 1. a) Estructura del B19V (PDB 1S58) (Kaufmann et al., 2004) y b) taxonomía del parvovirus B19 según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, 2014).

### 1.2.2 Manifestaciones clínicas, infección y respuesta inmune

Las infecciones por el B19V ocurren generalmente a finales del invierno y principios de la primavera, afectando principalmente a niños pequeños. La transmisión ocurre a través del contacto con secreciones del sistema respiratorio y por todo tipo de contacto con productos sanguíneos infectados (Rahbar et al., 2013). El B19V es causante de eritema infeccioso (también llamada quinta enfermedad) caracterizada por erupciones en las mejillas que posteriormente puede esparcirse al resto del cuerpo. Entre una gran variedad de complicaciones, puede causar artropatía aguda, crisis aplásicas transitorias, hidropesía fetal, anemia crónica y aplasia eritroide pura en pacientes inmunodeprimidos e incluso aborto en madres que carecen de inmunidad contra el virus (Aristi, 2002; Young et al., 2004).

Los receptores principales del B19V son el antígeno P (o globósido) y las integrinas  $\alpha_5\beta_1$ . Las células blanco principales son los progenitores eritroides BFU-E y CFU-E. Sin embargo, el tropismo del B19V se extiende a megacariocitos, hepatocitos y miocardios, entre otros (Servant-Delmas et al., 2016). Induce apoptosis en progenitores eritroides por la acción citotóxica de la proteína no estructural (NS) codificada en el genoma del virus (Gallinella, 2013).

El ciclo vírico de B19V, como el de aquellos virus de ADN no envueltos, comienza con la unión del virus a los receptores de las células blanco, internalización (endocitosis), translocación de su genoma al núcleo, replicación del ADN, transcripción, traducción, ensamble y encapsulamiento de ADN para finalmente llevar a cabo la lisis de la célula. Para su replicación, el B19V necesita de maquinaria enzimática del ciclo S (Heegaard et al., 2002).

Una vez que el virus ha entrado al organismo, se requiere menos de una semana para que ocurra la viremia durante la cual aparecen los primeros síntomas como fiebre y malestar general. La cuenta de reticulocitos desciende de manera dramática y hay una disminución de la hemoglobina de aproximadamente 1 g/dl en una persona sana. La segunda fase de síntomas se presenta cerca del día 17 a 18 y se caracteriza por erupciones cutáneas y comezón. La viremia disminuye con la aparición de anticuerpos específicos IgM (los cuales persisten por ocho o diez semanas) y anticuerpos IgG que persisten de por vida (Heegaard et al., 2002).

### 1.2.3 Estructura

Estructuralmente hablando, la cápside del B19V se encuentra constituido por 60 subunidades de dos proteínas estructurales (VP1 y VP2) dispuestas en 20 capsómeros (Figura 3). La proteína VP2 (58 kDa) (Figura 4) es la proteína mayoritaria que representa aproximadamente el 95% de la composición proteica; despliega los receptores y correceptores necesarios para la unión del virus a las células que infectan, así como los dominios que permiten el autoensamble. La proteína VP1 (81 kDa) es idéntica a la proteína VP2 a excepción de un fragmento adicional de 227 aminoácidos en el extremo amino terminal (llamada región única de VP1, VP1u). La proteína VP1 no puede autoensamblarse para formar cápsides ni tampoco es necesaria para el ensamble de cápsides con VP2. Sin embargo, VP1u contiene elementos críticos para la entrada del virus a las células como es un dominio de fosfolipasa tipo A2 (Servant-Delmas et al., 2016).

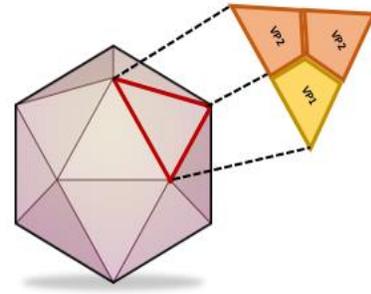


Figura 3. Representación caricaturizada de la formación del parvovirus B19 a partir de las proteínas VP1 Y VP2.

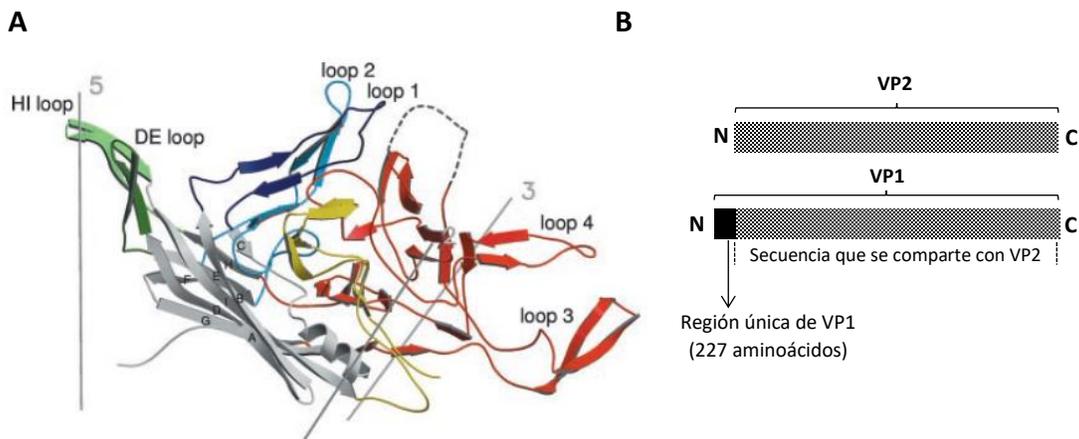


Figura 4. A. Estructura de la proteína VP2 (Kaufmann et al., 2004) (PDB 1S58) la cual está conformada, en esencia, por hebras  $\beta$  (gris) conectadas por asas. Se resalta la posición del asa desordenada 301-313 (línea negra discontinua) modelada por homología con el asa del virus adeno-asociado (genotipo 2). B. Esquema comparativo de la secuencia de la proteína VP2 y VP1 las cuales se diferencian en la región única de VP1 (227 aminoácidos) en el extremo amino.

#### 1.2.4 Genoma y diversidad genética

El genoma del B19V consiste en una sola molécula lineal de ADN de cadena sencilla de 5.5 kb (Summers, et. al 1983). En su DNA hay sólo un promotor que controla la síntesis de una proteína no estructural (NS1), las proteínas VP1 y VP2, y dos proteínas pequeñas de 7.5 y 11 kDa. NS1 actúa como activador de la transcripción reclutando numerosos factores de transcripción y participa en la replicación contribuyendo con sus propiedades de helicasa y endonucleasa. En ambos extremos del genoma presentan repeticiones terminales invertidas (palindrómicas) (Gallinella, 2013).

#### 1.3 ANTECEDENTES SOBRESALIENTES DEL PARVOVIRUS B19 COMO PARTÍCULA TIPO VIRUS

El trabajo con VLPs tienen orígenes relativamente recientes como aquel realizado en 1991 por Kajigaya y colaboradores quienes utilizaron baculovirus recombinantes para producir cápsides vacías del virus, compuestas de VP2 y distintos porcentajes de VP1. Concluyeron que las cápsides recombinantes enriquecidas con la proteína VP1 deberían servir de base para el desarrollo de vacunas contra el B19V.

Otros estudios de la época se enfocaron en el reconocimiento celular, ensayos de diagnóstico y desarrollo de vacunas (Bansal et al., 1993; Rueda et al., 1999; Enders et al., 2007). Posteriormente se comenzaron a trabajar con VLPs quiméricos en los que se añadieron, por ejemplo, una proteína reportera como la eGFP que ayudaría en la elucidación del mecanismo de infección y patogénesis (Gilbert, et. al 2005). Se puede encontrar un resumen muy completo de aportaciones académicas sobre el B19V en el artículo de revisión de Sánchez-Rodríguez y colaboradores (2010).

En el 2012 se reporta la construcción *in vitro* de una partícula tipo virus del parvovirus humano B19 a partir de VP2 recombinante. En dicho estudio se utilizaron VP2 silvestre y una proteína VP2 que incluía una etiqueta de histidinas (6x) en su extremo carboxilo terminal, las cuales fueron expresadas en *E. coli*. Los resultados mostraron que VP2 es capaz de formar VLPs *in vitro* a pH neutro y a 4 °C, mientras que en valores de pH ácidos o básicos se tienden a formar pequeños intermediarios (Sánchez-Rodríguez et al., 2012). Algunas de las técnicas utilizadas para la caracterización de las partículas fueron DLS, TEM, cromatografía de exclusión molecular, y gradientes de CsCl y de sacarosa. Obtenidas las partículas, también se describió una metodología para el encapsulamiento de ADN de doble cadena en estas partículas (Sánchez-Rodríguez et al., 2015).

A partir de este estudio base, y siguiendo la misma metodología, se lograron construir partículas tipo virus a partir de una mezcla de VP2 silvestre y VP2 quiméricas. Por ejemplo, se obtuvo una

partícula capaz de ensamblarse de manera estable aun cuando se añadió un péptido de 64 aminoácidos de la proteína F (215-278) del virus sincicial respiratorio (VSR) humano dentro del asa 62-75 de VP2. Esta asa tiene amplia movilidad y no presenta contactos críticos para la estabilidad de la cápside. Se observó que la presencia del péptido F<sub>215-278</sub> mejoró el tiempo de vida de las partículas antes de agregarse y finalmente sedimentarse, así mismo se observó incremento en la estabilidad coloidal (Santillán-Uribe et al., 2015).

En un estudio similar, se logró el ensamblaje de VLPs a partir de VP2 en cuyo extremo amino terminal se añadió un segmento antigénico (215-278 o 400-457) de la proteína de fusión F del VSR. Dentro de las construcciones antes mencionadas, se incluyó un sitio de corte para Factor Xa que al llevar a cabo el corte de los segmentos añadidos permitió demostrar la localización externa de los mismos. La antigenicidad de las VLPs se estudió mediante inmunizaciones en ratones BALB/c y la consecuente medición de los niveles de anticuerpos IgG contra VSR silvestre. Sin embargo, no se observó producción de anticuerpos contra VSR generados por la presencia de las VLPs quiméricas (Morán-García et al., 2016).

También se exploró la plasticidad estructural de estas VLPs modificando el asa 307-308 de VP2 (Figura 4A), en donde se insertaron la proteína sfGFP o la lipasa A de *Bacillus pumilus* (BpIA). Dicha asa mostró ser un sitio adecuado de modificación ya se encuentra localizada en el exterior de la cápside (una vez formada), tiene gran movilidad y, además, la adición de proteínas quiméricas en proporción 4:1 y 9:1 de VP2: quimera de VP2 (+sfGFP o +lip) no comprometió la competencia de los capsómeros para formar cápsides. La GFP retuvo la fluorescencia (incluso en condiciones desnaturizantes de GuHCl 3 M y urea 8 M), mientras que BpIA presentó actividad catalítica, aunque ésta disminuyó comparada con la actividad de su forma libre (Bustos-Jaimes et al., 2017).

El siguiente paso en el desarrollo de distintas VLPs fue la formación de estructuras supramoleculares más complejas. Para ello se diseñaron partículas que expusieran en la superficie hélices enrolladas que tienen la característica de enrollarse una sobre la otra y permiten formar grupos de VLPs. Se utilizaron dos péptidos complementarios que forman espirales enrolladas llamados E-coil y K-coil (Crescenzo et al., 2003) unidos al extremo amino terminal. Se demostró la existencia de interacciones múltiples entre partículas para formar oligoVLPs (Santillán-Uribe, 2017).

La evolución de las VLPs de B19V para convertirlas en una plataforma robusta y versátil para el transporte y entrega de moléculas, nos ha llevado a la construcción de partículas más complejas, mediante el ensamblaje de VLPs que incluyan a más de una proteína de fusión (partícula

multifuncional). En este proyecto se planteó construir este tipo de partículas a partir de varias proteínas de fusión, las cuales se describen en la sección 1.4. Algunas de las proteínas utilizadas en este proyecto fueron probadas en trabajos anteriores con el parvovirus B19. En general, se buscó que las proteínas fueran monoméricas, que no requirieran de modificaciones postraduccionales, que fueran capaces de replegarse tras su exposición a condiciones desnaturalizantes y que fuesen detectables de manera sencilla.

## 1.4 PROTEÍNAS DE FUSIÓN

### 1.4.1 Lipasa A de *Bacillus pumilus* GMA1 (BpIA)

Las lipasas (triacilglicerol acil hidrolasas, EC 3.1.1.3) son enzimas que hidrolizan los enlaces éster presentes en los triacilgliceroles liberando ácidos grasos y glicerol. En condiciones micro-acuosas, las lipasas pueden llevar a cabo la reacción inversa como son reacciones de esterificación, alcoholólisis y acidólisis (Gupta et al., 2004).

La lipasa A de *Bacillus pumilus* GMA1 (BpIA) es homóloga a la lipasa A de *Bacillus subtilis* (LipA), la cual ha sido ampliamente caracterizada. Ambas enzimas comparten el 80% de identidad en su secuencia de aminoácidos y pertenecen a la subfamilia 1.4 de la clasificación propuesta por Arpihny y Jaeger (1999). BpIA y LipA son proteínas globulares monoméricas de 181 aminoácidos y tienen un peso de molecular de 19.5 kDa (Bustos-Jaimes et al., 2010). Presentan un plegamiento clásico  $\alpha/\beta$  hidrolasa con 6 hebras- $\beta$  paralelas flanqueadas por 5 hélices- $\alpha$ . La triada catalítica está constituida por los residuos Ser77, Asp133 e His156, mientras que átomos de H de los grupos amida de los residuos Ile12 y Met78 forman la cavidad oxianiónica (Figura 5). El sitio catalítico se encuentra expuesto al disolvente debido a la ausencia de la tapa del sitio catalítico (Pouderoyen et al., 2001; Mora, 2008). En general, BpIA tiene preferencia por los ácidos grasos de cadena corta y no requiere de cofactores (Alcántara, 2009).

Las lipasas son herramientas biotecnológicas ampliamente utilizadas en la industria química, farmacéutica, cosmética y de alimentos debido a su alta estabilidad, enantioselectividad y especificidad (Jaeger, 2002). BpIA muestra notoria enantioselectividad por sustratos como el (R)-1-fenil etil acetato y (R)-feniletanol en reacciones de hidrólisis y síntesis, respectivamente. Dichas propiedades pueden ser modificadas a conveniencia mediante la selección adecuada de disolvente y temperatura de reacción (Bustos-Jaimes et al., 2013).

BpIA fue anteriormente utilizada para construir partículas tipo virus quiméricas basadas en el B19V (Bustos-Jaimes et al.,2017). Mediante ingeniería genética se insertó la secuencia del gen de BpIA dentro del gen de VP2, en la región que codifica para el asa 301-313 (Figura 4A), y fue expresada en *E. coli*. El asa 301-313 de VP2 presenta alta movilidad y se encuentra naturalmente expuesta en la superficie de las VLPs, de manera que ofrece la oportunidad de construir VLPs compuestas únicamente por VP2 quimérica, que exponen a BpIA al exterior de la partícula, y que no obstruye el ensamble de las VLPs ni elimina la actividad hidrolítica del dominio de BpIA. La partícula híbrida tuvo una actividad hidrolítica 20 veces menor a la mostrada por BpIA libre. En contraste, su estabilidad térmica a 40°C resultó ser 7 veces mayor a la de la enzima libre (Bustos-Jaimes et al.,2017).

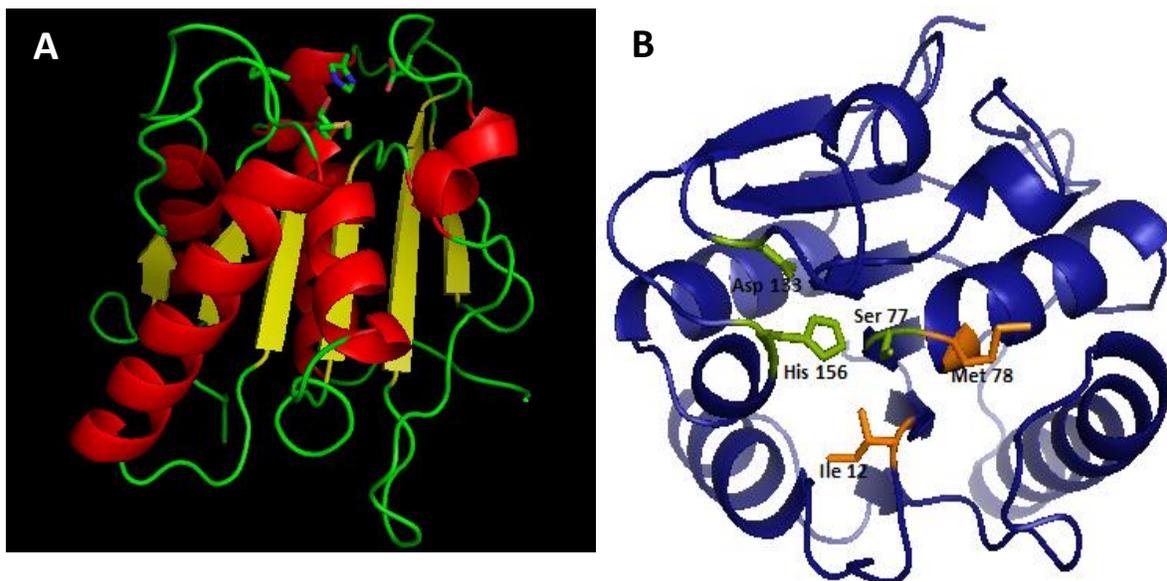


Figura 5. Modelo estructural de BpIA realizado por homología con Lip A de *B.subtilis* utilizando el software SWISS-MODEL (Biasini et al., 2014). A. Vista general de BpIA. B. Vista superior del sitio catalítico de BpIA, en color verde se resalta la triada catalítica (Ser77, Asp133 e His156) y en naranja se resalta los residuos que conforman la cavidad oxianiónica (Ile12 y Met78).

### 1.4.2 Proteína verde fluorescente (GFP) de *Aequorea victoria*

La proteína verde fluorescente (GFP; del inglés *Green Fluorescent Protein*) es una proteína monomérica soluble que emite fluorescencia cuando es excitada con luz ultravioleta (Reid et al., 1997). La GFP está compuesta de 238 aminoácidos (27 kDa) que forman un cilindro conformado por 11 hebras  $\beta$  con una hélice  $\alpha$  al centro y segmentos cortos helicoidales en la base del cilindro. Justo al centro de la proteína se encuentra un fluoróforo conformado por la ciclación y oxidación de los residuos de Ser65, Tyr 66 y Gly67 (Figura 6). El cromóforo, en un estado protonado (pH ácido o neutro), presenta un pico de absorción a una longitud de onda de 395 nm y uno de emisión a 508 nm. Sin embargo, en estado desprotonado el pico de absorción se presenta a 475 nm y el de emisión a 503 nm (Remington, 2011; Yang et al., 1996).

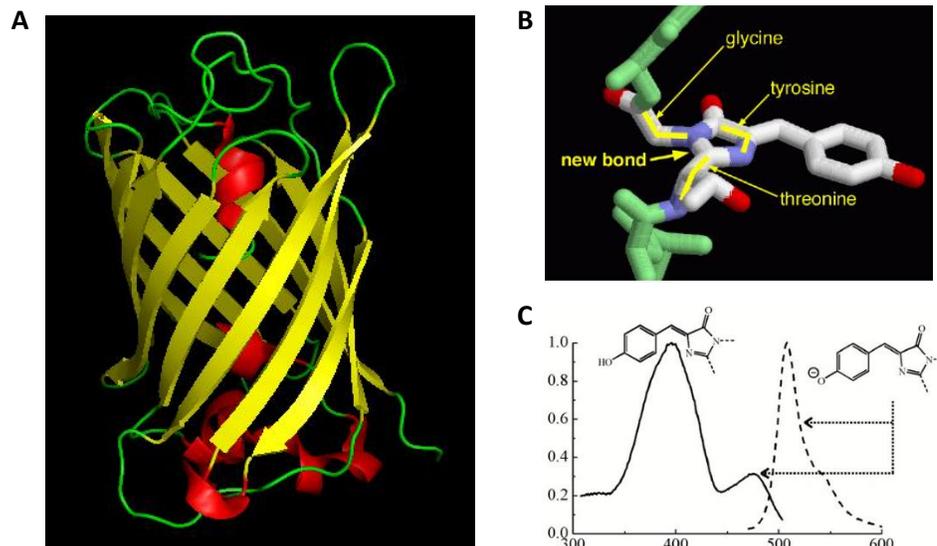


Figura 6. A. Estructura tridimensional de la GFP (PDB 2B3Q). B. Acercamiento al cromóforo de la GFP. Se resalta en amarillo la ciclación de los residuos de Ser65, Tyr 66 y Gly67 (imagen tomada del portal educativo de PDB, "Green Fluorescent Protein"). C. Espectro de excitación y emisión de la GFP silvestre (Tsien, 1998).

La GFP es relativamente estable al calor, pH alcalino, detergentes y agentes desnaturizantes, y es fácilmente replegable por diálisis o dilución. También tolera bastante bien las permutaciones circulares y la fusión con otras proteínas (Yang et al., 1996; Zimmer, 2002). Se trata de una proteína muy versátil, utilizada en general para determinar la localización celular de proteínas, la interacción y función de proteínas, así como reportero de la expresión de genes (Zimmer, 2002). Cabe mencionar que el plegamiento y solubilidad de la GFP silvestre pueden verse afectados cuando es expresada en sistemas heterólogos, y más aún en sistemas quiméricos en los cuales la proteína fusionada tiene problemas de plegamiento. Debido a lo anterior, se han desarrollado versiones más robustas de la GFP (Cormack et al., 1996; Crameri et al., 1996). En el presente trabajo se utilizó la GFP con superplegamiento (sfGFP) desarrollada por Pédélecq y colaboradores (2006), quienes obtuvieron una proteína muy robusta que se pliega adecuadamente incluso cuando se encuentra unida a proteínas mal plegadas; también muestra una mayor tolerancia a la permutación circular, mayor resistencia a agentes desnaturizantes, así como una mayor velocidad de plegamiento. La sfGFP presenta las mutaciones de otras variantes de GFP mejoradas (GFP reportera) y seis mutaciones adicionales (S30R, Y39N, N105T, Y145F, I171V y A206V) que en conjunto impiden la dimerización (atribuida a A206V), contribuyen al plegamiento, fluorescencia y velocidad de plegamiento (S30R y Y39N) mediante la formación de una red electrostática más extensa que incluye a aminoácidos que anteriormente no interactuaban (Figura 7).

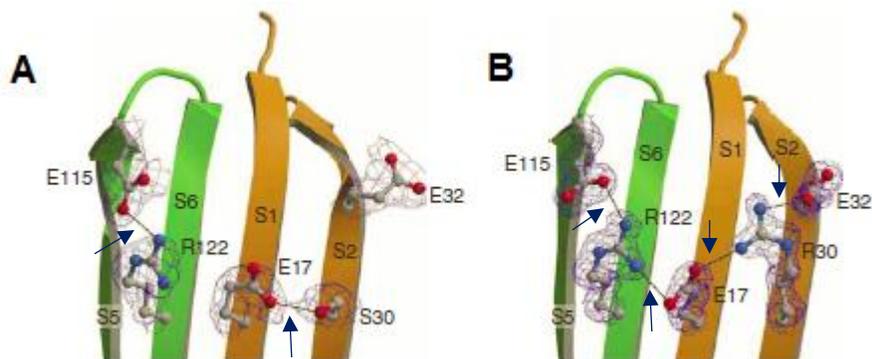


Figura 7. Diagrama de GFP reportera (A) y de sfGFP (B) (Pédélecq, 2006). Se resalta en el panel B que la introducción de la mutante S30R media la formación de una red electrostática extendida que involucra los aminoácidos E115 (S5), R122 (S6), E17 (S1), R30 (+) y E32 (S2) lo cual no sucede en el panel A (ver flechas azules).

La robustez y facilidad de rastreo de la GFP ha generado su amplia utilización como herramienta imagenológica en gran diversidad de sistemas. Gilbert y colaboradores (2005) construyeron VLPs quiméricos del parvovirus B19 mediante la inserción recombinante de la proteína verde fluorescente mejorada (eGFP) en el extremo amino terminal de la proteína VP2 (producida en células de *Spodoptera frugiperda* transformadas con baculovirus recombinantes). En este estudio se demostró que es posible obtener VLPs fluorescentes que exponen el dominio de la eGFP al exterior de la cápside y que, además, son capaces de internalizarse en células cancerosas y desplazarse al núcleo a través de la red de microtúbulos.

En un trabajo reciente de Bustos-Jaimes y colaboradores (2017), se insertó con ingeniería genética a la sfGFP en el asa 301-313 de la proteína VP2 del parvovirus B19. Dicha proteína quimérica fue expresada de manera heteróloga en células de *E. coli* y se demostró la formación exitosa de partículas tipo virus fluorescentes.

### 1.4.3 Isomaltasa de *Saccharomyces cerevisiae*

Las isomaltasas (EC 3.2.1.10) son oligo- $\alpha$ -1,6-glucosidasas que hidrolizan los enlaces  $\alpha$ -1,6-glucosídicos del extremo no reductor de isomaltooligosacáridos y dextrinas con retención de la configuración anomérica. De acuerdo con su secuencia de aminoácidos, las isomaltasas han sido clasificadas en la familia número 13 y a su vez en la subfamilia 31 de las glucósido hidrolasas (Yamamoto et al., 2011; Deng et al., 2014; Cantarel et al., 2009).

La isomaltasa de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) muestra una alta especificidad por sustratos pequeños (Deng et al., 2014) como isomaltosa o metil  $\alpha$ -D-glucopiranosido. No hidroliza fácilmente oligosacáridos más largos como la isomaltotriosa ni la isomaltotetraosa. La maltosa, por su parte, actúa como inhibidor competitivo de esta enzima (Yamamoto et al., 2010).

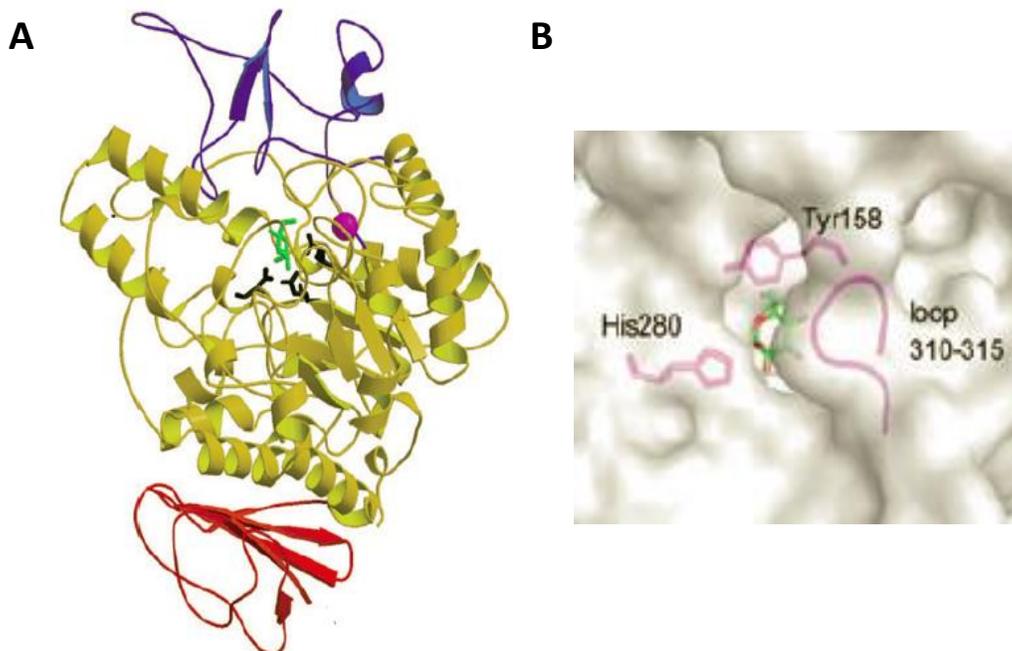


Figura 8. A. Estructura tridimensional de la isomaltasa de *S. cerevisiae*; el dominio A se resalta en amarillo (residuos catalíticos Asp215, Glu277 y Asp352 en negro,  $\text{Ca}^{2+}$  en magenta y una molécula de glucosa en verde), el dominio B en azul y el dominio C en rojo. B. Representación en superficie del sitio activo en complejo con maltosa. (Yamamoto et al., 2010).

La estructura general de la isomaltasa de *S. cerevisiae* consiste de tres dominios (Figura 8): A, B y C (Yamamoto et al., 2010 y 2011).

- Dominio A (residuos 1-113 y 190-512): Es el dominio catalítico, presenta un barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> que está conformado por ocho hebras  $\beta$  paralelas y ocho alfas hélices alternadas. Los residuos catalíticos altamente conservados Asp215, Glu277 y Asp352 se localizan en el lado del extremo carboxilo terminal de barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>.
- Dominio B (residuos 114-189): Es un dominio insertado entre la tercera hebra  $\beta$  y la tercera hélice del barril ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> del dominio A. Es rico en asas y presenta una hélice alfa corta y una hoja  $\beta$  antiparalela.
- Dominio C (residuos 513-519): Este dominio consiste en cinco hebras  $\beta$  antiparalelas que cierran hacia el dominio A.

El sitio catalítico tiene una topología de bolsillo poco profundo creado por los dominios A y B. La entrada al sitio catalítico está limitada por Tyr158, His280 y el asa 310-315. Los residuos Asp215 y Glu277 se localizan en el extremo carboxilo terminal de la hebra  $\beta$  número 4 y 5 respectivamente. Asp352 se localiza entre la hebra  $\beta$  número 7 y la hélice alfa número 7. El Asp215 actúa como nucleófilo en la catálisis mientras que el Glu277 actúa como catalizador general ácido-base. Se piensa que el Asp352 estabiliza al sustrato durante la catálisis para ayudar a acelerar la reacción de hidrólisis ácido-base (Yamamoto et al., 2010 y 2011).

#### 1.4.4 Dihidrofolato reductasa humana (DHFR)

La enzima dihidrofolato reductasa (EC 1.5.1.3) cataliza la reacción de reducción del folato y del 7,8-dihidrofolato (DHF) a 5,6,7,8-tetrahidrofolato (THF) utilizando al NADPH como cofactor. El THF es necesario para la biosíntesis de ADN y de aminoácidos por lo que la DHFR es una enzima vital que reestablece los niveles de THF por lo que se encuentra presente en todos los organismos (Schnell et al., 2004; Klön et al., 2002).

La DHFR humana (hDHFR) es una enzima monomérica de 21.3 kDa (186 aminoácidos) (Kovalevskaya et al., 2005) que consiste en 8 hebras beta, cuatro hélices alfas y regiones de asas. La proteína presenta un sitio de unión para el sustrato y otro para el cofactor, no presenta puentes disulfuro y no requiere de iones metálicos para llevar su función (Rao et al., 2013) (Figura 9).

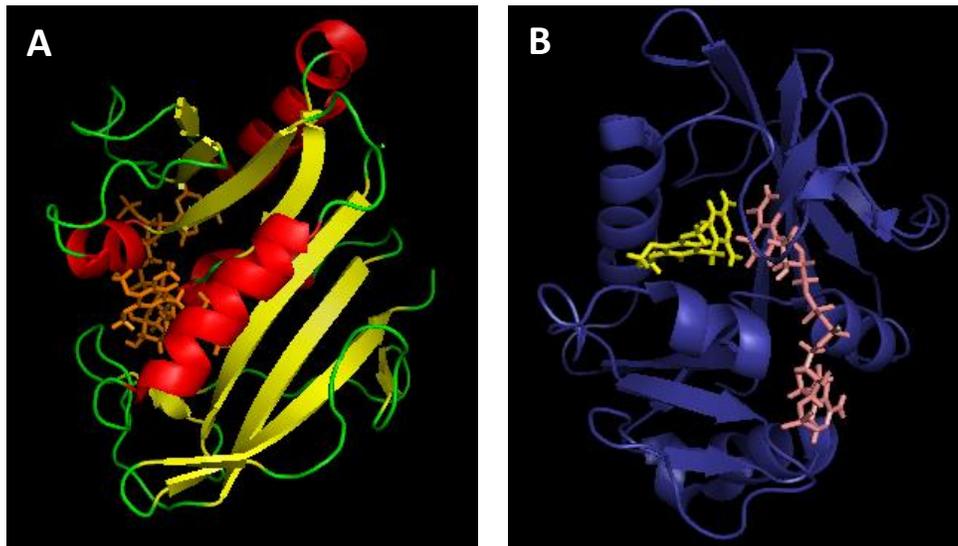


Figura 9. A. Representación tridimensional de la hDHFR (PDB 1YHO). B. Vista frontal de A en donde se muestra a la hDHFR en complejo con el inhibidor trimetoprima (rosa) y NADPH (amarillo).

Además de la hDHFR citosólica (codificada en el cromosoma 5, q22), McEntee y colaboradores (2011) encontraron que el anteriormente denominado pseudogen DHFRP4 (cromosoma 3), no solo se expresaba, sino que la isoforma de la DHFR producida (DHFR1, mitocondrial) era activa y podía complementar el fenotipo negativo de DHFR en células bacterianas y de mamífero.

La inhibición de la DHFR afecta negativamente la síntesis de ADN, por lo que es utilizada como blanco de fármacos antineoplásicos, antimicrobianos y antiinflamatorios (Banka et al., 2011). Por ejemplo, la trimetoprima (TMP) es un agente antibacterial que se une  $10^5$  veces más fuerte a la DHFR bacteriana que a la humana, dicha especificidad es resultado de alta cooperatividad positiva entre la trimetoprima y el NADPH (Schnell et al., 2004; Kovalevskaya et al., 2005). El metotrexato (MTX) al ser un análogo del ácido fólico, inhibe competitivamente a la hDHFR por lo que es utilizado para tratar ciertos tipos de cáncer y enfermedades inflamatorias ya que inhibe la rápida proliferación celular (Chen et al., 1984).

En pacientes con defectos congénitos que generan deficiencia enzimática en su hDHFR por mutaciones de cambio de sentido suelen presentar anemia megaloblastica y/o pancitopenia así como deficiencia severa de folatos en células cerebrales; dichos padecimientos pueden ser corregidos con tratamiento con ácido folínico (Banka et al., 2011).

Debido a que la hDHFR es una proteína monomérica cuya actividad puede ser fácilmente determinada por espectrofotometría (máximo de absorción del NADPH a 340 nm), ésta podría ser una enzima piloto adecuada para los objetivos de este trabajo.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Muchas de las aplicaciones biotecnológicas de las partículas tipo virus, refiriéndonos en especial a aquellas derivadas del B19V, pueden dirigirse al mejoramiento de la salud. Como antecedentes se mencionaron algunos de los avances sobresalientes logrados con estas partículas; desde que se determinó si era posible formar VLPs *in vitro*, la formación de partículas quiméricas, hasta la interacción de dos o más partículas para formar oligoVLPs. Continuando con esta tendencia, el presente trabajo tiene como objetivo crear partículas multifuncionales, es decir, que a través de la incorporación de proteínas exógenas sea posible tener una partícula capaz de albergar más de una función. Debido a que las VLPs conservan su capacidad de tropismo (ya sea la natural o modificada) podrían ser utilizados como terapia de compensación enzimática. Por lo general, los padecimientos de organismos superiores en donde se ve afectada alguna vía metabólica involucran a más de una enzima. La multifuncionalidad de la partícula podría ser entonces respuesta a la complejidad de los padecimientos y a la necesidad de máxima eficiencia para tratarlos albergando las funciones faltantes en una sola partícula. Además, dicha multifuncionalidad evita el uso de más de un tipo de partícula (cada tipo con una función distinta) lo cual podría incrementar la respuesta inmune en un organismo a tal grado de hacer este tratamiento inviable. Desde el punto de vista económico, resulta más costoso construir muchas partículas con una sola función que construir sólo una que albergue todas esas funciones.

Para hacer más eficientes a las VLPs multifuncionales, no solamente es necesario evaluar que estén todas las funciones en la población, sino asegurar que cada partícula las tiene de manera individual. Para ello propusimos una serie de purificaciones por cromatografía de afinidad, estrategia que puede ser implementada incluso a gran escala.

### 3. HIPÓTESIS

Dado la capacidad de la proteína VP2 y sus quimeras para formar cápsides de manera espontánea, es posible ensamblar partículas tipo virus multifuncionales *in vitro* a partir de VP2 y más de una VP2 quimérica.

### 4. OBJETIVOS

#### OBJETIVO GENERAL

Construir y caracterizar una partícula tipo virus multifuncional asegurando la presencia de las proteínas quiméricas que la constituyen mediante purificación por cromatografía de afinidad y ensayos de actividad/fluorescencia.

#### OBJETIVOS PARTICULARES

- Diseñar y sintetizar construcciones quiméricas individuales de VP2 que contengan a la sfGFP, lipasa de *B. pumilus* GMA1,  $\alpha$ -glucosidasa de *S. cerevisiae* o a la hDHFR.
- Expresar y purificar las proteínas VP2 y sus quimeras en *E. coli*.
- Determinar si es posible formar VLPs a partir de las quimeras, así como con distintas proporciones de VP2 silvestre.
- Aislar las VLPs formadas por las proteínas quiméricas de interés mediante cromatografía de afinidad.
- Determinar la retención de la fluorescencia/actividad catalítica de las proteínas quiméricas que conforman la partícula.
- Caracterizar las VLPs formadas por DLS, AFM, TEM, cromatografía de exclusión molecular, fluorimetría y gradientes de CsCl.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

En la figura 10 se muestra el esquema general de trabajo experimental

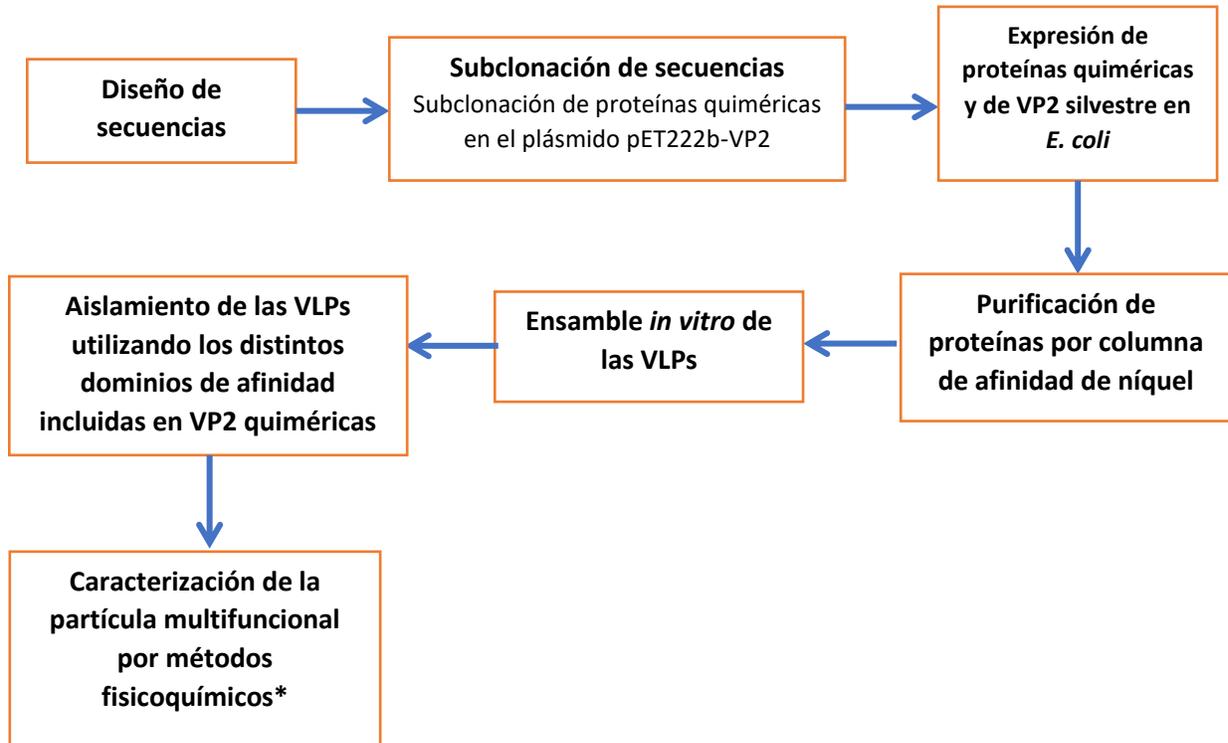
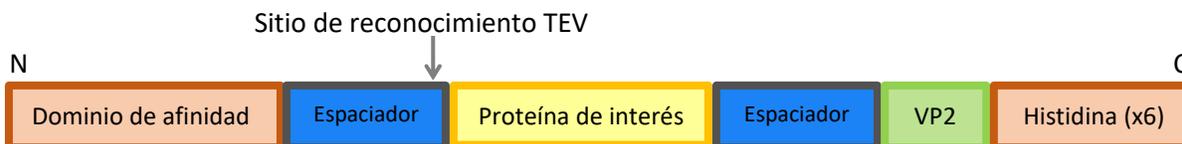


Figura 10. Esquema experimental general. \* DLS, AFM, TEM, SEM, gradientes de CsCl y determinación de actividad enzimática/fluorescencia.

## 5.1 DISEÑO DE SECUENCIAS

Las secuencias se diseñaron de acuerdo con la estructura general que se muestra en la figura 11.



Estructura general básica seguida para el diseño de secuencias (no se encuentra a escala).

En el extremo N-terminal se encuentra un dominio de afinidad, seguido por un espaciador compuesto por 11 residuos pequeños (GGSGGSGGSGG) para conferir flexibilidad a la molécula. Al final del primer espaciador se incluye en la secuencia un sitio de reconocimiento de la proteasa TEV (ENLYFQG), para eliminar el dominio de afinidad una vez que ya no sea necesario. Posteriormente se encuentra la secuencia de la proteína de interés seguida de un espaciador idéntico al primero, y finalmente la proteína VP2 con una etiqueta de 6xHis en el C-terminal. Las construcciones finales se muestran en la figura 12. El fragmento VP2-Histidina (x6) se encontraba integrado previamente al plásmido pET22b (pET22b-VP2) mientras que el resto de los genes fueron sintetizados químicamente y subclonados en el plásmido pBSK por Epoch Life Science, Inc. (pBSK-GST-GFP, pBSK-MBP-DHFR, pBSK-CBP-LIP y pBSK-ST-GLU). El procedimiento para generar las secuencias de trabajo se describe en la sección 5.2.



Figura 12. Descripción de fragmentos. 1. Quimera GFP ( $Q_{GFP}$ ) GST→Glutación S-Transferasa y GFP→Proteína Verde Fluorescente 2. Quimera DHFR ( $Q_{DHFR}$ ) MBP→Proteína de Unión a Maltosa DHFR→Dihidrofolato Reductasa 3. Quimera LIPASA ( $Q_{LIP}$ ) CBP→Péptido de Unión a Calmodulina LIP→Lipasa 4. Quimera GLU ( $Q_{GLU}$ ) ST→Etiqueta Strep GLU→ $\alpha$ -Glucosidasa. Todas las secuencias comparten un sitio de reconocimiento para la proteasa TEV (rectángulo rojo).

## 5.2 SUBCLONACIÓN DE SECUENCIAS

Los plásmidos **pET22b-L-VP2**, **pBSK-GST-GFP**, **pBSK-MBP-DHFR**, **pBSK-CBP-LIP**, **pBSK-ST-GLU** se utilizaron para transformar células de *E. coli* DH5 $\alpha$  las cuales fueron preparadas de acuerdo con el método de electrocompetencia descrito por Sambrook (Sambrook et al., 2001). El marcador de selección codificado en todos los plásmidos es el de la resistencia a ampicilina.

Las secuencias que codifican para los fragmentos GST-GFP, MBP-DHFR, CBP-LIP y ST-GLU fueron subclonadas individualmente en el vector de expresión pET22b-L-VP2 utilizando las enzimas *NdeI* y *BamHI*. El gen VP2 contenido en este vector contiene la secuencia del espaciador (*linker*, L), en cuya secuencia nucleotídica se encuentra un sitio de restricción para la enzima *BamHI*. Todos los fragmentos subclonados contenían esa misma secuencia en la región que codifica para su extremo C-terminal. Para la clonación, se llevó a cabo la digestión de los plásmidos pBSK-GST-GFP, pBSK-MBP-DHFR, pBSK-CBP-LIP y pBSK-ST-GLU y los productos se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, a partir del cual se extrajeron y purificaron los fragmentos GST-GFP, MBP-DHFR, CBP-LIP y ST-GLU (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega). Se utilizó una relación 3:1 de inserto a vector (previamente digerido) y se ligó con ligasa de T4 de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La mezcla de ligación se utilizó para transformar células electrocompetentes a partir de las cuales se purificó su plásmido (QIAGEN Plasmid DNA Purification Kit). Se realizó una digestión indagatoria con las enzimas *NdeI* y *XhoI* antes de su secuenciación (Laragen Inc., cebadores universales T7). Los plásmidos resultantes permitieron la expresión de las proteínas utilizadas en este proyecto. Para la producción de proteína VP2 nativa se utilizó el plásmido pETVP2H6 que incluye la etiqueta de 6xHis en el extremo C-terminal pero que no incluye el espaciador fusionado en el extremo N-terminal.

## 5.3 EXPRESIÓN DE VP2 Y PROTEÍNAS QUIMÉRICAS

Para la expresión de proteínas se utilizaron células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) a las cuales se les añade IPTG a una concentración final de 0.25 mM cuando el cultivo alcanza una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.6-0.8, permitiendo la sobreexpresión durante 16-20 h (overnight) a 30 °C (37 °C únicamente para la quimera con lipasa) y 250 rpm (180 rpm para quimera con la lipasa). A partir de este punto, a las distintas quimeras de VP2 se les denominará Q<sub>GFP</sub>, Q<sub>DHFR</sub>, Q<sub>LIP</sub>, y Q<sub>GLU</sub>, de acuerdo con la figura 12.

Se realizaron pruebas preliminares de expresión en volúmenes de 10 mL de cultivo. Las muestras de células lisadas (células completas, pellet y sobrenadante) fueron analizadas por SDS-PAGE (10-12 %). Para las proteínas quiméricas, se calculó el peso molecular teórico de cada una de ellas con la herramienta para calcular el peso molecular/punto isoeléctrico de ExPASy (Gasteiger et al., 2005). Una vez comprobada la sobreexpresión de las proteínas quiméricas se procedió a escalar la producción de las proteínas de interés. El escalamiento se realizó inoculando un litro de medio LB-ampicilina [100 µg/mL] con 5 mL de precultivo (200 mL de precultivo con D.O. de 0.6 para el caso de la lipasa). Una vez transcurrido el tiempo de inducción, las células fueron recolectadas por centrifugación a 8000 rpm durante 15 min a 4 °C. Las células fueron enjuagadas con una solución de NaCl al 0.9% para posteriormente ser almacenadas a -20 °C.

## 5.4 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR COLUMNA DE AFINIDAD DE NÍQUEL

### 5.4.1 Lisis celular y limpieza de cuerpos de inclusión

El pellet recuperado a partir de un litro de cultivo celular se resuspendió en 40 mL de amortiguador de lisis (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM; pH 6.3). El homogenizado fue sonicado durante 20 min, que incluye ciclos de 20 s de descanso y 20 s de sonicado. La muestra se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min. Los cuerpos de inclusión fueron recuperados mediante decantación y posteriormente resuspendidos en amortiguador de lavado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, tritón X-100 al 2%, urea 3 M; pH 6.3). La mezcla se sonicó durante 3 min con ciclos de 20 s de descanso y 20 s de sonicado y se centrifugó nuevamente a 12,000 rpm durante 15 min (para recuperar nuevamente los cuerpos de inclusión). El procedimiento de lavado se repitió tres veces más, pero adicionando DTT a una concentración de 2 mM. Se realizó un último lavado con amortiguador de lisis con el fin de eliminar excesos de urea, detergente y DTT.

Los cuerpos de inclusión de VP2, Q<sub>GFP</sub> y Q<sub>LIP</sub> se resuspendieron en 30 mL de amortiguador de solubilización (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 300 mM, DTT 2 mM, GuHCl 5 M; pH 7.5) mediante agitación magnética a 4 °C. Para el caso de Q<sub>GLU</sub> y Q<sub>DHFR</sub> se utilizó el amortiguador de solubilización con una concentración de GuHCl de 4 M.

#### 5.4.2 Purificación de proteína

Los cuerpos de inclusión resuspendidos en amortiguador de solubilización se centrifugaron a 13,000 rpm durante 20 min a 4 °C con el fin de eliminar aquellas partículas insolubles residuales en forma de un precipitado, este último fue separado del sobrenadante por decantación. Adicionalmente el sobrenadante se microfiltró utilizando filtros de 0.45 µm. Las soluciones con cuerpos de inclusión clarificados se purificaron por columna de afinidad Protino Ni-TED.

Los pasos generales descritos en los protocolos de usuarios de purificación por afinidad son: equilibrado de la columna, cargado de la proteína, lavado de columna y elución de la proteína de interés. Para equilibrar la columna (que se encuentra previamente en agua) se adicionaron 3 volúmenes de columna del amortiguador A ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 300 mM, glicerol 2.5 % v/v y GuHCl 3 M; pH 7.5). Posteriormente se agregaron de 3 a 5 mL de proteína solubilizada y luego se adicionaron 0.5 volúmenes de columna del amortiguador B ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 300 mM y GuHCl 3 M; pH 7.5), lo cual permite recuperar la proteína no unida tras su paso por la columna. Para el caso de la proteína VP2, la mayoría de las proteínas que no son de interés son eliminadas con un gradiente de imidazol; dichos lavados comprenden 0.5 volúmenes de columna del amortiguador C1 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 15 mM y GuHCl 3 M; pH 7.5), 0.5 volúmenes de columna del amortiguador C2 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 30 mM y GuHCl 3 M; pH 7.5) y 0.5 volúmenes de columna del amortiguador D ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 1 M, imidazol 30 mM y GuHCl 3 M; pH 7.5). Finalmente, la proteína es eluida con 1.5 volúmenes de columna del amortiguador E ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 1 M, imidazol 500 mM y GuHCl 3 M; pH 7.5). Para el caso de la purificación de  $Q_{\text{LIP}}$ ,  $Q_{\text{DHR}}$  y  $Q_{\text{GFP}}$ , las proteínas contaminantes son eliminadas mediante lavados con dos volúmenes de columna de amortiguador C3 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM y GuHCl 3 M; pH 7.5) únicamente. Para  $Q_{\text{GLU}}$ , el lavado se realizó con 50 mL de amortiguador C4 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 5 mM y GuHCl 3 M; pH 7.5). La elución de todas las proteínas quiméricas se llevó a cabo como se describió para la proteína VP2.

El proceso de purificación fue monitoreado por SDS-PAGE (10 -12 %). Las fracciones que contienen la proteína de interés fueron concentradas por ultrafiltración utilizando unidades Amicon (Millipore) con tamaño de corte de 50 kDa (VP2 y  $Q_{\text{LIP}}$ ) y 100 kDa ( $Q_{\text{GLU}}$ ,  $Q_{\text{GFP}}$  y  $Q_{\text{DHR}}$ ). Durante este paso también se eliminó el imidazol utilizando el amortiguador de almacenamiento sin imidazol (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM y GuHCl 4 M; pH 8.0).

## 5.5 ENSAMBLE *IN VITRO* DE LAS VLPs

El ensamble de partículas se realizó dializando 0.5 mg/mL de proteína total en un volumen final de 1.5 mL contra 50 mL de amortiguador PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, L-Arg 0.2 M, pH 7.4) durante 36 h a 4 °C haciendo un cambio de amortiguador cada 12 h. Se utilizó una membrana de acetato de celulosa con un corte nominal de 14 kDa. La eliminación de la condición desnaturalizante generada por la presencia del GuHCl permite a las subunidades de proteína comenzar a ensamblarse de manera espontánea.

Las condiciones de ensamble de VLPs exploradas se resumen en la tabla 1. En color gris oscuro se resaltan las pruebas individuales de ensamble realizadas a partir de VP2 y VP2 quimérica únicamente (100%). En color gris claro se destaca el ensamble de partículas a partir de VP2 (75%) y distintas proporciones molares de proteínas quiméricas (25%). Una vez que se corroboró que las distintas quimeras eran capaces de formar partículas tipo virus y que además conservaban su actividad catalítica/fluorescencia, se construyeron VLPs con más de una quimera (12.5 % de cada una). Q<sub>DHFR</sub> no mostró actividad catalítica por lo que no fue incluida en ningún sistema multifuncional.

Tabla 1. Resumen de las condiciones de ensamble exploradas.

Muestra	VP2	Q <sub>LIP</sub>	Q <sub>GLU</sub>	Q <sub>DHFR</sub>	Q <sub>GFP</sub>
VP2 100%	100%	-	-	-	-
Q <sub>LIP</sub> 100%	-	100%	-	-	-
Q <sub>GLU</sub> 100%	-	-	100%	-	-
Q <sub>DHFR</sub> 100%	-	-	-	100%	-
Q <sub>GFP</sub> 100%	-	-	-	-	100%
Q <sub>LIP</sub> 25%	75%	25%	-	-	-
Q <sub>GLU</sub> 25%	75%	-	25%	-	-
Q <sub>DHFR</sub> 25%	75%	-	-	25%	-
Q <sub>GFP</sub> 25%	75%	-	-	-	25%
VP2 75% - (Q <sub>LIP</sub> + Q <sub>GFP</sub> )25%	75%	12.5%	-	-	12.5%
VP2 75% - (Q <sub>LIP</sub> + Q <sub>GLU</sub> )25%	75%	12.5%	12.5%	-	-

\*Se utilizaron proporciones molares. Para el cálculo se consideró que la cápside está conformada por 60 subunidades de proteína (60 subunidades hacen el 100% de la cápside); de esta manera, en ensambles con un 25% de la proteína quimérica se establece que la cápside teóricamente está conformada por 15 subunidades de proteína quimérica y 45 subunidades de VP2 silvestre (75%).

## 5.6 AISLAMIENTO DE VLPs MULTIFUNCIONALES POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

La introducción de un dominio de afinidad único a cada una de las proteínas quiméricas permite purificar de manera selectiva a aquellas VLPs que incorporaron a dicha proteína quimérica en la cápside. Los pasos generales de purificación comunes en toda cromatografía de afinidad son: equilibrado de columna con 3-5 volúmenes de columna (VC) de amortiguador de unión, cargado de proteína (en máximo 1-3 VC), lavado de columna con 3-5 VC de amortiguador de unión/lavado para eliminar impurezas y finalmente elución con 3-5 volúmenes de columna de amortiguador de elución. En la tabla 2 se resumen los amortiguadores utilizados para la purificación de VLPs según sugerencias del fabricante (GE Healthcare Life Sciences). Se hicieron adaptaciones al sistema de trabajo.

Tabla 2. Resumen de amortiguadores utilizados para columnas de afinidad

COLUMNA/RESINA	AMORTIGUADORES
<b>Calmodulin Sepharose 4B</b>	<b>Unión/lavado:</b> 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl <sub>2</sub> , L-Arginina 200 mM, pH 7.5 <b>Elución:</b> 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, L-Arginina 200 mM, pH 7.5 *Los fosfatos del PBS precipitan con el Ca <sup>2+</sup>
<b>Columna pre-empacada GSTrap HP</b>	<b>Unión/lavado:</b> PBS <sub>ARG</sub> (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 mM, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM, L-Arginina 200 mM; pH 7.4) <b>Elución:</b> PBS <sub>ARG</sub> adicionado con 10 mM de glutatión reducido/50 mM Tris-HCl, 10 mM glutatión reducido, pH 8.0
<b>Columna pre-empacada MBPTrap HP</b>	<b>Unión/lavado:</b> PBS <sub>ARG</sub> (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 mM, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM, L-Arginina 200 mM; pH 7.4) <b>Elución:</b> PBS <sub>ARG</sub> adicionado con 10 mM de maltosa.
<b>Columna pre-empacada StrepTrap HP</b>	<b>Unión/lavado:</b> PBS <sub>ARG</sub> . NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 mM, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM, L-Arginina 200 mM; pH 7.4 <b>Elución:</b> PBS <sub>ARG</sub> adicionado con 2.5 mM de destiobiotina.

Las columnas de afinidad antes mencionadas también fueron exploradas para la purificación de proteínas quiméricas (100%) para lo cual se dializaron los cuerpos de inclusión (solubilizados en amortiguador de repliegamiento) contra PBS<sub>ARG</sub> (secciones anteriores).

Para el caso de las VLPs que incluían a más de una quimera (VP2-Q<sub>LIP</sub>-Q<sub>GLU</sub> y VP2-Q<sub>LIP</sub>-Q<sub>GFP</sub>), el procedimiento general de purificación se describe en la tabla 3. En ambos casos se partió de 5.6 mg de proteína dispuestos en 8 unidades de ensamble. Los procedimientos de purificación como

exclusión molecular y gradientes de CsCl son descritos detalladamente en párrafos anteriores. Las VLPs formados por VP2-Q<sub>LIP</sub>-Q<sub>GFP</sub> no fueron purificadas por columna GSTrap debido al mal plegamiento del dominio de afinidad GST. En la siguiente sección se describe un análisis más detallado de protocolos de replegamiento y ensamble alternativo los cuales mostraron disminuir notablemente el rendimiento de ensamble. Debido a esto se decidió no incluir dichos procedimientos en el protocolo general.

Tabla 3. Pasos de purificación de VLPs multifuncionales

VLP MULTIFUNCIONAL 1 (VP2-Q <sub>LIP</sub> -Q <sub>GLU</sub> )	VLP MULTIFUNCIONAL 2 (VP2-Q <sub>LIP</sub> -Q <sub>GFP</sub> )
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Purificación de VLPs por cromatografía de exclusión molecular.</li> <li>2. Cambio de amortiguador PBS<sub>ARG</sub> a TRIS<sub>ARG</sub> (cartuchos de ultrafiltración).</li> <li>3. Purificación de VLPs con Q<sub>LIP</sub> utilizando la resina Calmodulin Sepharose 4B.</li> <li>4. Cambio de amortiguador TRIS<sub>ARG</sub> a TRIS<sub>ARG</sub> para eliminar el Ca<sup>2+</sup> y el exceso de EDTA. En este paso también se aprovechó para concentrar la muestra (cartuchos de ultrafiltración).</li> <li>5. Purificación de VLPs con Q<sub>GLU</sub> utilizando la columna StrepTrap HP.</li> <li>6. Caracterización de VLPs.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aislamiento de VLPs de intermediarios por cromatografía de exclusión molecular (rango de tamaño de 24 nm a 35 nm). Este paso también se utilizó para realizar cambio de amortiguador de PBS<sub>ARG</sub> a Tris<sub>ARG</sub>.</li> <li>2. Purificación de VLPs con Q<sub>LIP</sub> utilizando la resina Calmodulin Sepharose 4B.</li> <li>3. Caracterización de VLPs.</li> </ol>

### 5.6.1 Replegamiento del dominio de afinidad glutatión-s-transferasa de Q<sub>GFP</sub>

El dominio de afinidad glutatión-S-transferasa (GST) es ampliamente utilizado para favorecer el plegamiento y solubilización de proteínas. Sin embargo, es recomendado para purificaciones en condiciones no desnaturalizantes pues la GST es afectada por la presencia de agentes caotrópicos. También presenta problemas de plegamiento por almacenamiento en cuerpos de inclusión lo cual se hizo evidente durante las pruebas de purificación. Se observó que no existía unión Q<sub>GFP</sub>-columna por lo que se recurrió a protocolos de replegamiento de proteínas almacenadas en cuerpos de inclusión basados en detergentes. De acuerdo con Tao y colaboradores (2010), es posible inducir el plegamiento correcto de GST mediante la incubación de los cuerpos de inclusión (recuperados de la lisis celular) con una solución de 1% sarkosyl, 2% triton x-100 y 20 mM de CHAPS (amortiguador de replegamiento). Una vez que se determinó que era posible replegar el dominio GST se procedió a verificar la capacidad de ensamble de Q<sub>GFP</sub> tratada con amortiguador de replegamiento. En este

punto también se exploró dializar  $Q_{GFP}$  previamente resuspendida en amortiguador de almacenamiento (GuHCl 4 M) contra amortiguador de replegamiento, lo cual resultó infructuoso.

El tratamiento de los cuerpos de inclusión obtenidos directamente a partir de la lisis celular con amortiguador de replegamiento fue extendido a  $Q_{DHFR}$  la cual, como se describe en la sección de resultados, no presentó actividad catalítica.

## 5.7 CARACTERIZACIÓN DE LAS VLPs

### 5.7.1 Aislamiento de VLPs por cromatografía de exclusión molecular

Además de los gradientes de CsCl, la cromatografía de exclusión molecular fue utilizada para la separación y purificación de las distintas especies presentes en las muestras de ensamblados. Se utilizó una columna empacada con resina Sephacryl S-500 HR conectada a un equipo HPLC (waters 2487 dual  $\lambda$  Absorbance detector, waters 600S Controller) con el cual se estableció un flujo de 0.5 mL/min de amortiguador PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM,  $Na_2HPO_4$  10 mM,  $KH_2PO_4$  10 mM, L-Arginina 200 mM; pH 7.4) o Tris (Tris base 50 mM, NaCl 150 mM, Arg 200 mM; pH 7.4). El seguimiento de la purificación se llevó a cabo mediante la medición de absorbancia a una longitud de onda de 280 nm. Cada inyección de muestra consistió en dos volúmenes de ensamblado, es decir, en alrededor de 1.4 mg de proteína en 3 mL de amortiguador.

La exclusión molecular también fue una técnica explorada para la purificación de proteínas quiméricas (100%) para lo cual se dializaron cuerpos de inclusión (solubilizados en amortiguador de replegamiento) contra  $PBS_{ARG}$  (secciones anteriores).

### 5.7.2 Determinación de tamaño de partícula por dispersión dinámica de luz (DLS)

La técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) es una técnica que permite estimar el tamaño de partículas en solución. Las muestras dializadas se microfiltraron utilizando filtros de 0.45 y 0.22  $\mu m$  y se analizaron en el equipo Zetasizer  $\mu V$ . Se utilizó un índice de refracción de 1.33, una viscosidad de 1.003 cp y una temperatura de 20 °C. Para cada muestra se realizaron 10 determinaciones con 10 mediciones de 10 segundos cada una; el tamaño de partícula final es el resultado de promediar las 10 mediciones.

### 5.7.3 Aislamiento de VLPs por gradientes de cloruro de cesio

Además de determinar el tamaño promedio de las partículas presentes en solución, se utilizó un gradiente continuo de CsCl que permite separar las distintas poblaciones de partículas como son VLPs, agregados e intermediarios de acuerdo a su densidad. En un tubo de centrífuga de 5 mL (Beckman Coulter) se colocaron 3.5 mL de amortiguador PBS con CsCl a una densidad de 1.33 g/mL (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, 10 mM de EDTA y 0.5% de Tritón X-100; pH 7.4). Sobre el amortiguador PBS se colocaron 500 µL de muestra teniendo precaución de no mezclar el amortiguador y la muestra. Las muestras se ultracentrifugaron a 55,000 rpm durante 10 h con 43 min a 20 °C en una ultracentrífuga Beckman Optima XL-100K (rotor 60Ti). Una vez formado el gradiente se obtuvieron dos bandas características descritas previamente por Sánchez-Rodríguez y colaboradores (2014). La banda uniforme de mayor densidad fue recuperada cuidadosamente con ayuda de una micropipeta. Para ello, se retiró el volumen sobre la banda y posteriormente la banda de interés (100 µL). Se calculó la densidad de la banda considerando un volumen de 100 µL y la masa de la muestra previamente medida con una balanza analítica (BP 221S, Sartorius). Las bandas fueron dializadas frente a PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM; pH 7.4) durante 24 h contra 1000 veces el volumen recolectado y finalmente analizadas por SDS-PAGE.

### 5.7.4 Caracterización de VLPs por microscopía de fuerza atómica (AFM)

Para facilitar el análisis de las VLPs por microscopía de fuerza atómica, las muestras analizadas fueron sometidas a gradientes de CsCl o bien, a cromatografía de filtración en gel (descritos previamente). Se colocaron 30 µL de la muestra sobre un disco de mica adherente la cual fue a su vez colocada sobre un disco magnético. La muestra fue llevada a sequedad en condiciones de presión reducida y a temperatura de 25°C. Se utilizó un microscopio de sonda de barrido Innova (Veeco Instruments Inc.) que cuenta con una sonda de barrido de alta resolución Hi-Res-C19/Cr-Au (MikroMasch). El radio de punta de 1 nm aplica una fuerza promedio constante de 0.5 N/m y una media de frecuencia de resonancia de 65 kHz. Las imágenes fueron generadas utilizando el modo táctil.

### 5.7.5 Caracterización de VLPs por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Para el análisis por TEM se utilizó un microscopio de transmisión electrónica JEOL JEM 1200 EX II. La muestra fue analizada utilizando un voltaje de 80 kV y para ello se colocaron 10 µL de muestra previamente filtrada (0.22 µm) sobre una rejilla de cobre recubierta con formvar. La muestra se dejó

fijar durante 5 minutos para después retirar el exceso de volumen con papel filtro. La rejilla se dejó fijar durante 1 min. Posteriormente se colocaron 5  $\mu$ L de ácido fosfotúngstico al 3% pH 7 sobre la rejilla y se dejó reposar durante 3 minutos. Nuevamente se retiró el exceso de volumen y se dejó secar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

#### 5.7.6 Medición de actividad/fluorescencia de las VLPs

La retención de la actividad enzimática es una característica muy importante que deben tener las VLPs formadas, para ello, se describen a continuación los ensayos de actividad para  $Q_{LIP}$ ,  $Q_{DHFR}$ ,  $Q_{GLU}$  y fluorescencia para el caso de  $Q_{GFP}$ .

##### **Determinación cuantitativa de actividad de $Q_{LIP}$**

Para el análisis de actividad de  $Q_{LIP}$  se utilizó 4-Nitrofenilacetato (4-NPA o pNPA) el cual es un sustrato pequeño y análogo al sustrato natural de las lipasas (triacilgliceroles). La hidrólisis de pNPA genera 4-Nitrofenol (4-NP o pNP) el cual es un compuesto cromogénico que permite seguir la progresión de la reacción mediante la medición del cambio de absorbancia a una longitud de 400 nm (y longitudes cercanas) donde se presenta el máximo de absorción.

La mezcla de reacción se ajustó a un volumen de 500  $\mu$ L añadiendo 440  $\mu$ L de amortiguador PBS (sin arginina ya que el sustrato es inestable en presencia de arginina), 50  $\mu$ L de VLPs (con una concentración no menor a 0.7 mg/mL), y 10  $\mu$ L de pNPA 10 mM disuelto en acetonitrilo. La progresión de la reacción se llevó a cabo midiendo el cambio de absorbancia en un espectrofotómetro (CARY 400, Varian) a una longitud de onda de 410 nm a 25 °C. Se colocó un control de hidrólisis espontánea de pNPA en presencia de arginina para lo cual se sustituyó el volumen agregado de enzima por amortiguador PBS<sub>ARG</sub>. Para calcular el número de moles de pNP producidos durante la reacción se realizó una curva patrón de Abs<sub>400</sub> contra concentración de pNP; el valor de la pendiente (absortividad molar) permitió relacionar el valor de una absorbancia dada con una concentración de pNP.

##### **Determinación cuantitativa de actividad de $Q_{GLU}$**

Similar a como se determinó la actividad de  $Q_{LIP}$ , para  $Q_{GLU}$  se utilizó 4-nitrofenil- $\alpha$ -glucopiranosido (pNPG) cuya hidrólisis también genera pNP. En este caso, la longitud de onda utilizada para el seguimiento de la progresión de reacción fue de 405 nm (espectrofotómetro CARY 400 Varian) y una temperatura de 25 °C. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 600  $\mu$ L para lo cual se añadieron 200  $\mu$ L de pNPG 15 mM, 80  $\mu$ L de VLPs (con una concentración no menor a 1.5 mg/mL) y

320  $\mu\text{L}$  de amortiguador  $\text{PBS}_{\text{ARG}}$  (en este caso, el pNPG es muy estable en presencia de arginina). Se colocó como control una mezcla de reacción en la que se sustituye al volumen de enzima agregado por un volumen igual de amortiguador  $\text{PBS}_{\text{ARG}}$ . Se realizó una curva patrón de pNP medido a una absorbancia de 405 nm.

#### Determinación cuantitativa de actividad de $Q_{\text{DHFR}}$

A diferencia de  $Q_{\text{LIP}}$  y  $Q_{\text{GLU}}$ , para la medición de la actividad de  $Q_{\text{DHFR}}$  se utilizó el sustrato natural de la enzima, es decir, el ácido dihidrofólico (DHF). El DHF es reducido para generar tetrahidrofolato (THF) en presencia de NADPH. El NADPH tiene un máximo de absorción a una longitud de onda de 340 nm. Se consume una molécula de NADPH por cada molécula de DHF reducido de manera que hay un decremento en la absorbancia. La mezcla de reacción y controles se prepararon de acuerdo con la tabla 4.

Tabla 4. Mezcla de reacción para medición de actividad de  $Q_{\text{DHFR}}$

	Amortiguador PBS 1x ( $\mu\text{L}$ )	$Q_{\text{DHFR}}$ ( $\mu\text{L}$ )	Amortiguador $\text{PBS}_{\text{ARG}}$ 1x ( $\mu\text{L}$ )	NADPH 10 mM ( $\mu\text{L}$ ) En PBS 1X	DHF 10 mM ( $\mu\text{L}$ ) En PBS 10X
Control 1	920	-	80	6	-
Control 2	920	-	80	-	5
Control 3	920	-	80	6	5
Actividad	920	80	-	6	5

#### Determinación cuantitativa de fluorescencia de $Q_{\text{GFP}}$

El análisis de fluorescencia se llevó a cabo en un fluorómetro ISS PC1 midiendo el espectro de emisión de la muestra de 490 a 600 nm tras ser excitada con una longitud de onda de 485 nm a una temperatura de 25 °C.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 DISEÑO DE SECUENCIAS

En las figuras 13, 14, 15 y 16 se muestran las secuencias de aminoácidos de las proteínas quiméricas  $Q_{DHFR}$ ,  $Q_{GLU}$ ,  $Q_{LIP}$  y  $Q_{GFP}$ , respectivamente. Como se mencionó anteriormente, dichas proteínas quiméricas siguen la estructura general descrita en la figura 11. En cada una de las secuencias se resalta en color rosa la secuencia del dominio de afinidad correspondiente; en color azul se resalta el espaciador; en color rojo, el sitio de reconocimiento de la proteasa TEV; en color amarillo, la proteína de interés; en color verde, la secuencia de VP2 y finalmente en naranja, la etiqueta de histidinas. El corte y empalme teórico de las secuencias se obtuvo con el programa Serial Cloner 2.6.

> QUIMERA DHFR ( $Q_{DHFR}$ ) → 1185 aminoácidos, 130 179.68 Da

MKIEEGKLVWINGDKGYNGLAEVGKKFEKDTGKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGPDIIFWAHDREFGGYAQSGLLAEITPKAFQDK  
LYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALS LIYNKDLLPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGYDIK  
DVGVDNAGAKAGLTFVLVDLIKHKHMNADTDYSIAEAFNKGETAMTINGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGI  
NAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPLGAVALKSYEELVKDPRIAATMENAQKGEIMPNIQMSAFWYAVRTAVINAASGR  
QTVDEALKDAQTNSSSSNNNNNNNNNLGIEGRISHMSMGRRDIVDGSEFPAGN**GGSGSGSGGENLYFQGMVGS**LNLCIVAVSQN  
MGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRM**TTSSVEGKQNLVIMGKKTWFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQ**  
PELANKVDMMVWIVGGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGIKYKFEVYEKND**GGSGG**  
**SGGSGG**MTSVNSAEASTGAGGGGSPVKSMSWSEGATFSANSVTCTFSRQFLIPYDPEHHYKVFSPAASSCHNASGKEAKVCTISPIMG  
YSTPWRYLDFNALNLFSPLEFQH LIENYGSIPDALTVTISEIAVKDVTDKTGGGVQVTDSTTGRLCMLVDHEYKYPYVLGQGGDTLAP  
ELPIWVYFPPQYAYLTVGDVNTQGISGDSKKLASEESAFVLEHSSFQLLGTGGTATMSYKFPVPPENLEGCSQHFYEMYNPLYGSRG  
VPDTLGGDPKFRSLTHEDHAIQPNFMPGPLVNSVSTKEGDSSTGAGKALTGLSTGTSQNTRISLRPGVSPYPYHHWDTDKYVTGIN  
AISHGQTTYGNAEDKEYQQGVGRFPNEKEQLKRLQGLNMHTYFPNKGTTQYTDQIERPLMVGSVWNRALHYESQLWSKIPNLDDS  
FKTQFAALGGWGLHQPPPQIFLKILPQSGPIGGIKSMGITTLVQYAVGIMTVMTFKLGLRKATGRWNPQPGVYPPHAAGHLPVLYD  
PTATDAKQHRRHGFEKPEELWTAKS RVHPLE**HHHHHH**

Figura 13. Secuencia de aminoácidos de la quimera DHFR ( $Q_{DHFR}$ ). En rosa se muestra la secuencia que corresponde al dominio de afinidad proteína de unión a maltosa. En azul, la secuencia del espaciador. En rojo, el sitio de reconocimiento de la proteasa TEV. En amarillo, la secuencia que corresponde a la dihidrofolato reductasa humana. En verde, la proteína VP2 común en todas las secuencias. En naranja, la etiqueta de afinidad 6xHis.

>QUIMERA  $\alpha$ -GLUCOSIDASA ( $Q_{GLU}$ )  $\rightarrow$  1186 aminoácidos, 133 838.44 Da

MWShpQFEKGGSGSGSGSGGENLYFQGMtISSAHPEtEPKWWKEATFYQIYPASFKDSNDDGWGDMKGIASKLEYIKELGADAIWI  
SPFYDSPQDDMGYDIANYEKVWPTYGTNEDCFALIEKTHKLGMKFITDLVINHCSEHEWFKESRSKTNPKRDWFFWRPPKGYDAEG  
KPIPPNNWKSYPFGGSAWTFDEKtQEFYLRlFCSTQPDlnWENEDCRKAIYESAVGYWLDHGVDGFRIDVGSLSYKVVGLPDAPVVDK  
NSTWQSSDPYTLNGPRIHEFHQEMNQFIRNRVKDGREIMTVGEMQHASDEtKRlyTSASRHSELfNFsHTDVGtSPLFRYnlVpFEL  
KDWKIALAELFRYINGTDCWSTIYlENHDQPRsITRFGDDSPKnrVlSGKllSVllSALTGtlyVYqGqELGQlNFKNWPVEKYEDVEIRN  
NYNAIKEEHGENSEEMKKFLAIALISRdHARTPMQWSREEPNAGfSGPSAKPWFYlNDSfREGINVEDEIKDPNSVlNfWKEALKFRK  
AHKDtIVYGYDFEFIDlDNKKlFSfTKKYNNKtLFAAlNFSSDAtDFKIPNDSSfKLEfGNYPKKEVDASSRtLKPWEGRiYISEGGSGGS  
GGSGGMtSVNSAEASTGAGGGGSGNPVKSMWSEgATfSANSVtCTfSRQFLIPYDPEHhYKvFSPAASSCHNASGKEAKVCTISPIMGY  
STPWRYLDFNALNlFFSPLEfQHliENYGSiAPDALtVtISEiAVKdVtDKtGGGVQVtDSttGRlCMLVDHEyKYpVlGqGQDtLAPe  
LPIWVYfPPQYAYlTVGDVntQGISGDSKklASEESAFYVLEHSSfQLlGTGGTATMSYKfPPVPPENLEGCSQHfYEMYNPLYGSRLGV  
PDTLGGDPKfRSLTHEdHAIQPQNfMPGPlVNSVStKEGDSStGAGKALTGLStGtSQNTRISLRPGPVsQPYPHhWdTDKYVtGINAI  
SHGQTYGNAEDKEYQqGVGRFPNEKEQLKRLQGLNMHTYfPNKGTQqYTDQIERPLMVGSVWNRRALHYESQLWSKIPNLDDSFK  
TQFAALGGWGLHQPPPQlFLKlPQSGPIGGIKSMGIttLVQYAVGIMtVtMTfKlGLRkATGRWNPQPGVYPPHAAGHLpVlYDPT  
ATDAKQHRRHGFEKPEELWtAKSRVHPLHHHHHH

Figura 14. Secuencia de aminoácidos de la quimera  $\alpha$ -GLUCOSIDASA( $Q_{GLU}$ ). En rosa se muestra la secuencia que corresponde al dominio de afinidad strep. En azul, la secuencia del espaciador. En rojo, el sitio de reconocimiento de la proteasa TEV. En amarillo, la secuencia que corresponde a la  $\alpha$ -glucosidasa. En verde, la proteína VP2 común en todas las secuencias. En naranja, la etiqueta de afinidad 6xHis.

>QUIMERA LIPASA ( $Q_{LIP}$ )  $\rightarrow$  799 aminoácidos, 86 586.26 Da

MKRRWKKNFIAVSAANRFKKISSGALGGSGSGSGSGGENLYFQGMaEHNpVVMVHGIGGASYNFFSIKSYLVGQGW  
DRNQLYAIIDFKTGNNRRNGPRLSRfVKDVLdKtGAKKvDIVAHSMGGANTLYIKNLdGGDKIENVVTIGGANLVS  
SRALPGTDPNQKILYtSVYSSADLIVVNSLRLIGARNVLIHGvGHIGllTSSQVKGYIKeGLNGGGQNTNGGSGSGSGS  
GMTSVNSAEASTGAGGGGSGNPVKSMWSEgATfSANSVtCTfSRQFLIPYDPEHhYKvFSPAASSCHNASGKEAKVCTIS  
PIMGYSTPWRYLDFNALNlFFSPLEfQHliENYGSiAPDALtVtISEiAVKdVtDKtGGGVQVtDSttGRlCMLVDHEyKY  
PYVLGQGDtLAPeLPIWVYfPPQYAYlTVGDVntQGISGDSKklASEESAFYVLEHSSfQLlGTGGTATMSYKfPPVPPe  
NLEGCSQHfYEMYNPLYGSRLGVpDtlGGDPKfRSLTHEdHAIQPQNfMPGPlVNSVStKEGDSStGAGKALTGLStG  
TSQNTRISLRPGPVsQPYPHhWdTDKYVtGINAIshGQTYGNAEDKEYQqGVGRFPNEKEQLKRLQGLNMHTYfPNKG  
TQqYTDQIERPLMVGSVWNRRALHYESQLWSKIPNLDDSFKTQFAALGGWGLHQPPPQlFLKlPQSGPIGGIKSMGItt  
LVQYAVGIMtVtMTfKlGLRkATGRWNPQPGVYPPHAAGHLpVlYDPTATDAKQHRRHGFEKPEELWtAKSRVHPL  
HHHHHH

Figura 15. Secuencia de aminoácidos de la quimera LIPASA ( $Q_{LIP}$ ). En rosa se muestra la secuencia que corresponde al dominio de afinidad péptido de unión a calmodulina. En azul, la secuencia del espaciador. En rojo, el sitio de reconocimiento de la proteasa TEV. En amarillo, la secuencia que corresponde a lipasa. En verde, la proteína VP2 común en todas las secuencias. En naranja, la etiqueta de afinidad 6xHis.

> QUIMERA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE (Q<sub>GFP</sub>) → 1061 aminoácidos, 117 976.26 Da

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIRYIADKHNML  
GGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSRAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVL  
YMDPMCLDAFPKLVCFKKR IEAIPQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSPEFIVTDGGSGSGGS  
GGENLYFQGMRKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATNGKLTLLKFICTTGKLPVPWPPTLVTTLYGVQCF  
ARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGTYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNFNSHN  
VYITADKQKNGIKANFKIRHNVEDGSQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSVLSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGIT  
HGMDELYKGGSGSGSGSGG MTSVNSAEASTGAGGGGSPVKSMWSEGATFSANSVTCTFSRQFLIPYDPEHHYKVFS  
PAASSCHNASGKEAKVCTISPIMGYSTPWRYLDFNALNLFSPLEFQH LIENYGS IAPDALTVTISEIAVKDVTDKTGGGVQ  
VTDSTTGRLCMLVDHEYKYPYVLGQGQDTLAPELPIWVYFPPQYAYLTVGDVNTQGISGDSKKLASEESAFYVLEHSSFQL  
LGTGGTATMSYKFPVPPENLEGCSQHFYEMYNPLYGSRLGVPDTLGGDPKFRSLTHEDHAIQPQNFMPGPLVNSVSTK  
EGDSSSTGAGKALTGLSTGTSQNTRISLRPGPVSQPYHHWDTDKYVTGINAISHGQTTYGNAEDKEYQQGVGRFPNEKE  
QLKRLQGLNMHTYFPNKGTTQYTDQIERPLMVGSVWNRRLHYESQLWSKIPNLDDSFKTQFAALGGWGLHQPPPQI  
FLKILPQSGPIGGIKSMGITTLVQYAVGIMVTMTFKLGLRKATGRWNPQPGVYPPHAAGHLPYVLYDPTATDAKQHR  
HGF EKPEELWTAKS RVHPLEHHHHHH

Figura 16. Secuencia de aminoácidos de la quimera GFP (Q<sub>GFP</sub>). En rosa se muestra la secuencia que corresponde al dominio de afinidad Glutación S-Transferasa. En azul, la secuencia del espaciador. En rojo, el sitio de reconocimiento de la proteasa TEV. En amarillo, la secuencia que corresponde a la proteína verde fluorescente. En verde, la proteína VP2 común en todas las secuencias. En naranja, la etiqueta de afinidad 6xHis.

## 6.2 SUBCLONACIÓN DE SECUENCIAS

En la figura 17 se muestra un gel de agarosa al 1% donde se observan los productos de la digestión del plásmido pET22b-VP2 con las enzimas *NdeI* y *XhoI*. Se realizaron las digestiones individuales para confirmar el buen funcionamiento de las enzimas de restricción utilizadas. La restricción doble permitió corroborar la identidad del fragmento subclonado.

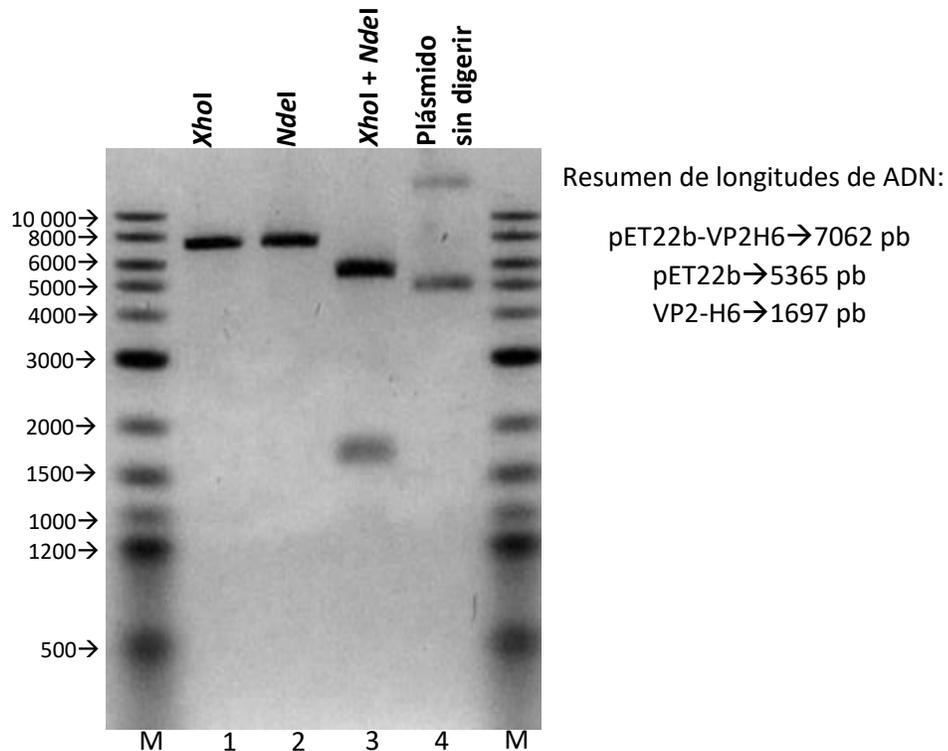


Figura 17. Gel de agarosa al 1%. Se muestran los productos de reacciones de digestión del plásmido pET22b-VP2 con las enzimas de restricción 1. *XhoI*, 2. *NdeI*, 3. *NdeI* y *XhoI*. 4. Control, plásmido sin digerir. M, marcador de peso.

Del mismo modo, en la figura 18, se presentan los geles de agarosa que muestran los productos de digestión de los plásmidos pBSK-GST-GFP, pBSK-MBP-DHFR, pBSK-CBP-LIP y pBSK-ST-GLU. Cada uno de ellos se sometió a una restricción doble con las enzimas *NdeI* y *BamHI* con el fin de corroborar el tamaño del inserto.

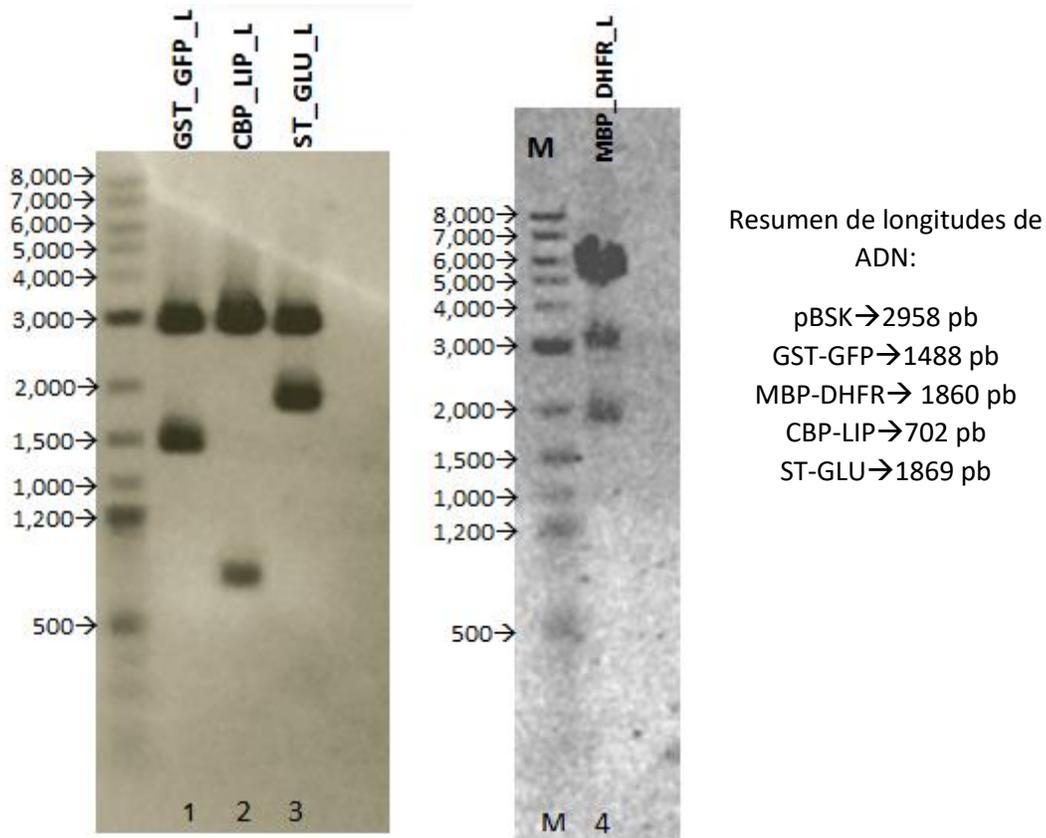
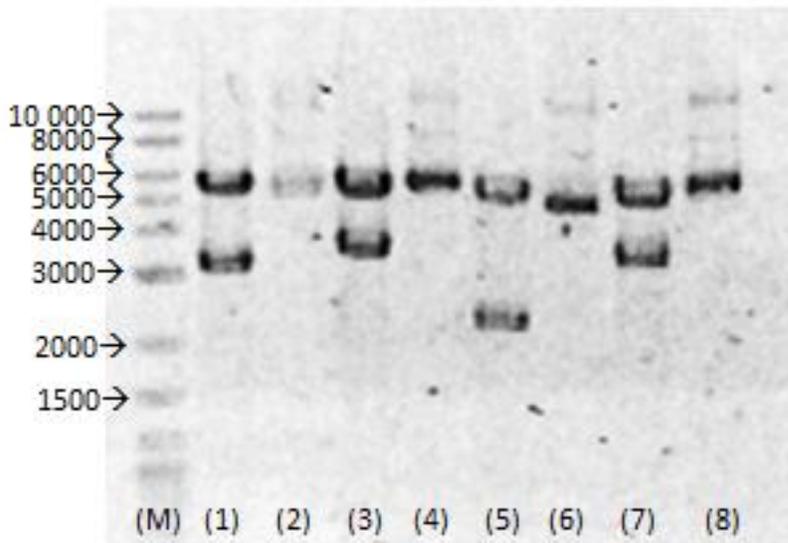


Figura 18. Gel de agarosa al 1% donde se muestran los productos de digestión de los plásmidos: 1. pBSK-GST-GFP, 2. pBSK-CBP-LIP 3. pBSK-ST-GLU 4. pBSK-MBP-DHFR (digestión incompleta en 4) con enzimas *NdeI* y *BamHI*.

De acuerdo con el procedimiento descrito para la subclonación, las mezclas de ligación fueron utilizadas para transformar células de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Se obtuvieron entre 6 y 15 colonias totales. Se seleccionaron de dos a tres colonias para el análisis del fragmento incorporado en el vector mediante su digestión con las enzimas *NdeI* y *XhoI*. En la figura 19 se muestran los productos de la digestión de los plásmidos procedentes de las colonias seleccionadas. Una vez que se corroboró que el tamaño del inserto podría corresponder con el fragmento deseado las muestras fueron secuenciadas.



Resumen de longitud de construcciones

pET22b → 5365 pb  
 GST-GFP-VP2 → 3183 pb  
 MBP-DHFR-VP2 → 3555 pb  
 CBP-LIP-VP2 → 2397 pb  
 ST-GLU-VP2 → 3564 pb

Figura 19. Gel de agarosa al 1% de las digestiones de los plásmidos pET22b-GST-GFP-VP2 (1), pET22b-MBP-DHFR-VP2 (3), pET22b-CBP-LIP-VP2 (5), pET22b-ST-GLU-VP2 (7) con enzimas *NdeI* y *XhoI*. Los carriles (2), (4), (6) y (8) muestran controles (plásmido sin digerir) de la construcción correspondiente al carril inmediato anterior.

### 6.3 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS Y VP2

En la figura 20 se muestra el análisis de sobreexpresión de proteínas quiméricas mediante SDS-PAGE de lisados celulares. Al comparar los carriles de las células que fueron inducidas con IPTG con respecto a su control (células sin inducir) se observa una clara sobreexpresión de proteína en el peso molecular teórico esperado (GST-GFP-VP2 → 118 kDa, MBP-DHFR-VP2 → 130 kDa, CBP-LIP-VP2 → 87 kDa y ST-GLU-VP2 → 134 kDa).

Así mismo, se llevó a cabo el análisis de la localización intracelular de las proteínas de interés mediante el análisis por SDS-PAGE de la fracción soluble e insoluble de los lisados celulares inducidos con IPTG. En la figura 21 se observa que  $Q_{GFP}$ ,  $Q_{LIP}$ ,  $Q_{GLU}$  y  $Q_{DHFR}$  se localizan mayoritariamente en la fracción insoluble, lo cual es consistente con la observación de que tanto VP2 como quimeras basadas en esta proteína suelen formar cuerpos de inclusión (Morán-García et al., 2016; Soto-Román et al. 2017).

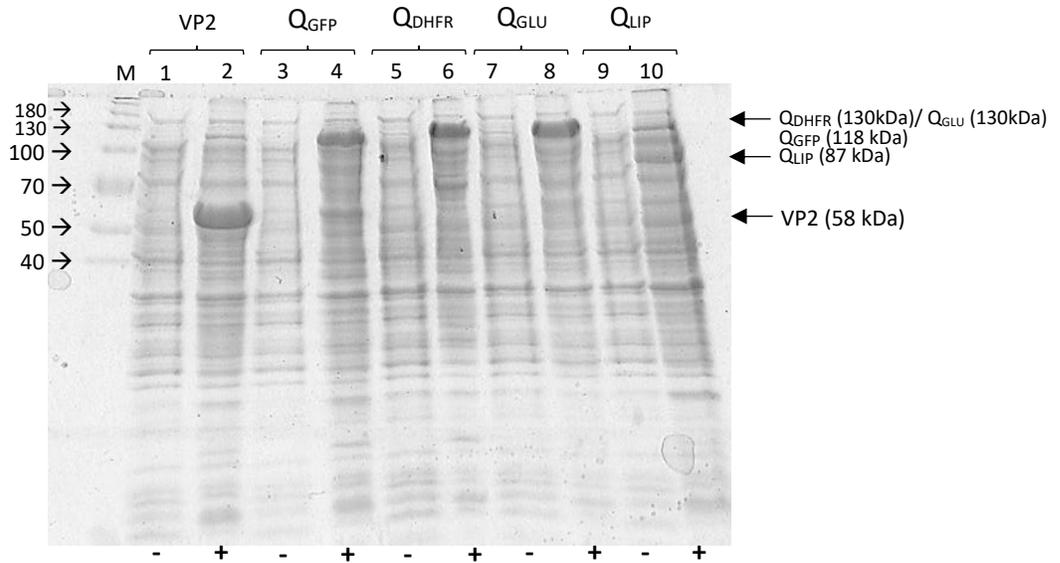


Figura 20. SDS-PAGE de lisados celulares que muestra la sobreexpresión de VP2 (2) y las proteínas quiméricas Q<sub>GFP</sub> (4), Q<sub>DHFR</sub> (6), Q<sub>GLU</sub> (8) y Q<sub>LIP</sub> (10) tras la inducción de las células con IPTG (+). En los carriles (1), (3), (5), (7) y (9) se muestra el lisado celular sin inducir (-) de Q<sub>GFP</sub>, Q<sub>DHFR</sub>, Q<sub>GLU</sub> y Q<sub>LIP</sub> respectivamente. (M) Marcador de peso. Las proteínas de interés están señaladas adicionalmente con un triángulo en color negro.

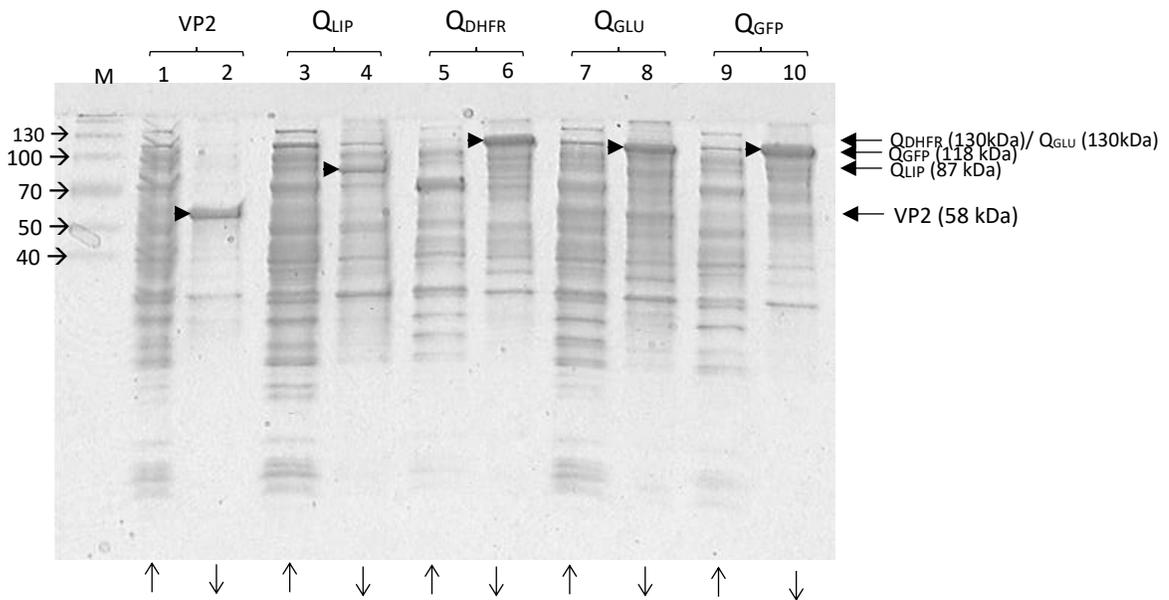


Figura 21. SDS-PAGE de la fracción insoluble (↓) de los lisados celulares de VP2 (2) y las proteínas quiméricas Q<sub>LIP</sub> (4), Q<sub>DHFR</sub> (6), Q<sub>GLU</sub> (8) y Q<sub>GFP</sub> (10). En los carriles (1), (3), (5), (7) y (9) se muestra la fracción soluble (↑) de Q<sub>LIP</sub>, Q<sub>DHFR</sub>, Q<sub>GLU</sub> y Q<sub>GFP</sub> respectivamente. (M) Marcador de peso. Las proteínas de interés están señaladas con un triángulo en color negro.

## 6.4 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR COLUMNA DE AFINIDAD DE NÍQUEL

En la figura 22A se muestra un SDS-PAGE que reúne a las cinco proteínas de trabajo purificadas por cromatografía de afinidad de níquel bajo condiciones desnaturalizantes. En la figura 22B se muestra a QLIP y a VP2 diez veces más concentrada lo cual permite observar la pureza de las mismas. En la tabla 5 se muestran los rendimientos de purificación.

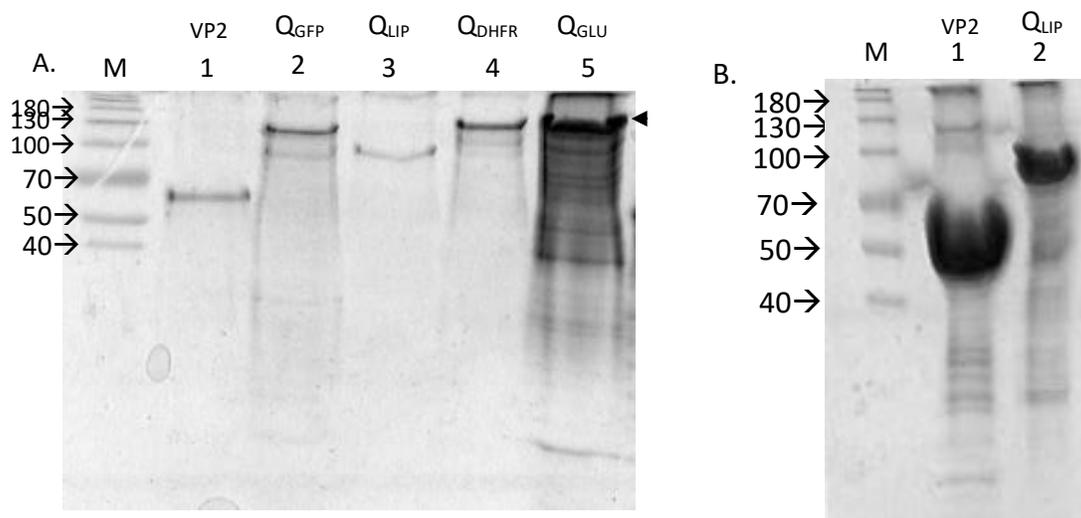


Figura 22. SDS-PAGE de proteínas purificadas. A. Resumen de 1. VP2, 2. Q<sub>GFP</sub>, 3. Q<sub>LIP</sub>, 4. Q<sub>DHFR</sub>, 5. Q<sub>GLU</sub>. B. Proteína VP2 (1) y Q<sub>LIP</sub> (2) altamente concentradas donde se observa que la pureza observada en el panel A no es efecto de la dilución.

Tabla 5. Resumen de rendimientos de proteína purificada

Proteína	Concentración final (mg/mL)	Volumen obtenido (mL)	Rendimiento (mg proteína/ L cultivo)
VP2	6.26	25	62.60
Q <sub>GFP</sub>	1.20	3	35.85
Q <sub>GLU</sub>	5.72	25	57.20
Q <sub>DHFR</sub>	0.84	3	25.05
Q <sub>LIP</sub>	3.05	25	30.50

## 6.5 AISLAMIENTO DE VLPs MULTIFUNCIONALES POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

Tras el ensamble de VLPs que incluían alguna de las proteínas quiméricas, éstas fueron aisladas mediante cromatografía de afinidad haciendo uso de los dominios de afinidad únicos de cada quimera (Figura 23, panel B y C). Es este paso se corroboró el correcto plegamiento de los dominios de afinidad de las quimeras  $Q_{DHFR}$ ,  $Q_{LIP}$  y  $Q_{GLU}$ , pero no así para el caso del dominio GST de  $Q_{GFP}$  por lo cual se recurrió al protocolo de replegamiento que se describe en la sección 5.6.1. Por otro lado,  $Q_{DHFR}$  no mostró actividad catalítica medible y no fue considerada para formar sistemas multifuncionales. Como se describe en la tabla 1 se construyeron dos sistemas multifuncionales ( $VP2-Q_{LIP}-Q_{GLU}$  y  $VP2-Q_{LIP}-Q_{GFP}$ ) los cuales fueron aislados según el procedimiento descrito en la tabla 3. Se presentan a continuación los resultados de dichos procedimientos.

### **AISLAMIENTO DE VLPs MULTIFUNCIONALES 1 [VP2 75% - ( $Q_{LIP}+ Q_{GLU}$ ) 25%]**

En la figura 23 se muestran los cromatogramas del proceso de aislamiento de VLPs multifuncionales  $VP2-Q_{LIP}-Q_{GLU}$ . En el panel A se muestra un cromatograma de la filtración en gel en el que se observan tiempos de retención congruentes con los observados previamente para VLPs (sección 6.6.1). Debido a que la resina de calmodulina funciona por gravedad, no es posible seguir espectrofotométricamente la purificación de la muestra. Sin embargo, una alícuota de dicho procedimiento fue sometida a un SDS-PAGE (panel B). Para el segundo paso de purificación se utilizó la columna StrepTrap HP la cual fue conectada a un equipo HPLC lo cual permitió obtener el cromatograma que se observa en el panel C, las VLPs eluidas se registran al minuto 40. La muestra se concentró a un volumen de 50  $\mu$ L y se sometió a un SDS-PAGE (panel D). En la sección 6.6 se muestran otras técnicas de caracterización de VLPS.

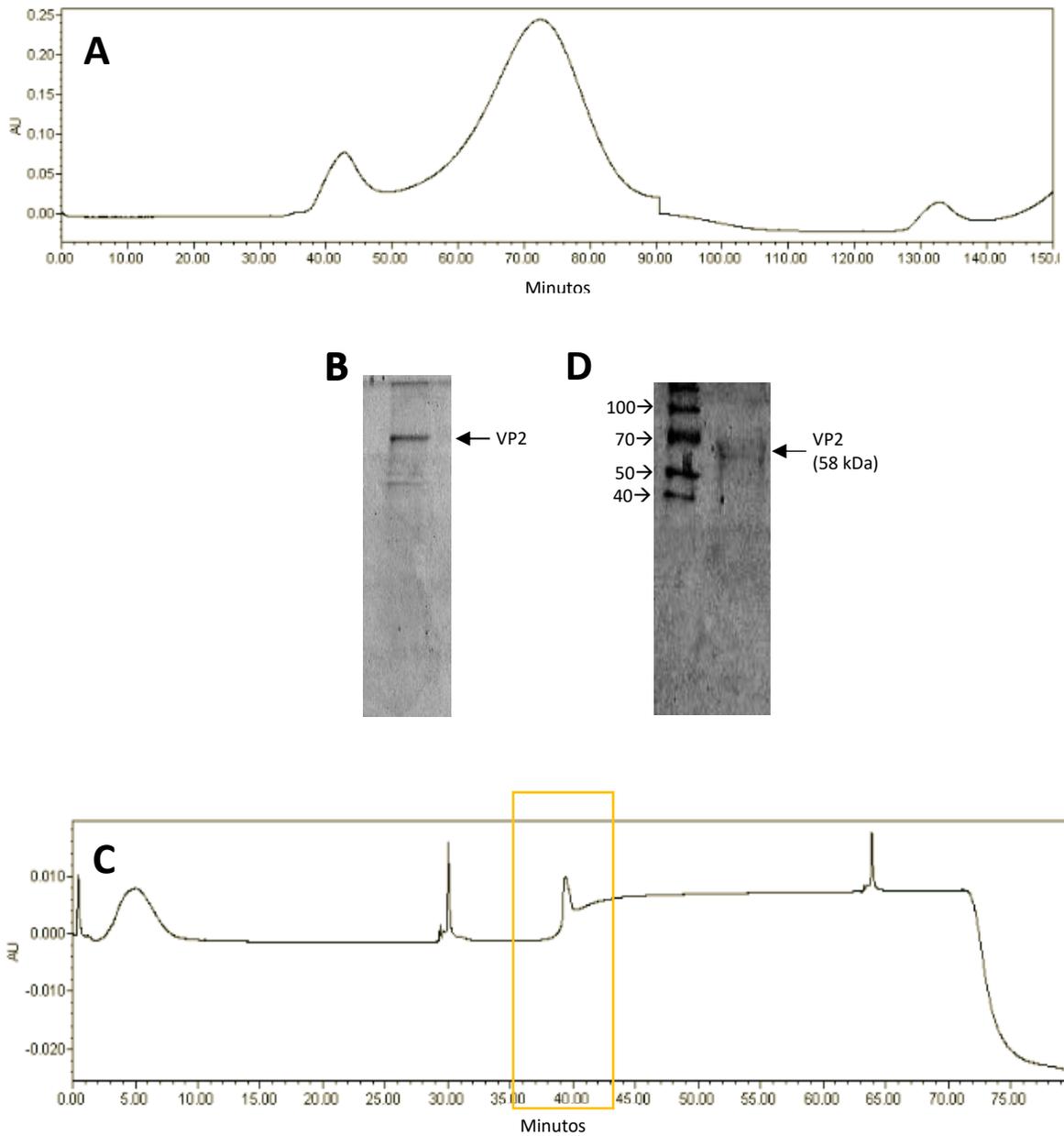


Figura 23. Aislamiento de VLPs multifuncionales VP2-Q<sub>LIP</sub>-Q<sub>GLU</sub>. A. Cromatograma de exclusión molecular de los ensambles VP2-Q<sub>LIP</sub>-Q<sub>GLU</sub>; se tomaron las fracciones que corresponden al minuto 68-72. B. SDS-PAGE de las VLPs tras purificación por la columna de afinidad a calmodulina. C. Cromatograma de la purificación por columna de afinidad StrepTrap HP. D. SDS-PAGE de las VLPs tras purificación por columna de afinidad StrepTrap HP.

## AISLAMIENTO DE VLPs MULTIFUNCIONALES 2 [VP2 75% - (Q<sub>LIP</sub>+ Q<sub>GFP</sub>) 25%]

Otro sistema de VLPs multifuncionales con el que se trabajó fue aquel conformado por Q<sub>LIP</sub> y Q<sub>GFP</sub>. Como se describió anteriormente, el dominio de afinidad de Q<sub>GFP</sub> (GST) no se repliega correctamente tras el contacto con GuHCl de manera que la purificación de dichas VLPs multifuncionales no incluye el paso de purificación utilizando el dominio GST. En la figura 24 se muestra un SDS-PAGE de la muestra aislada siguiendo el procedimiento descrito en la tabla 3. En la sección 6.6 se muestran otras técnicas de caracterización de formación de VLPs.

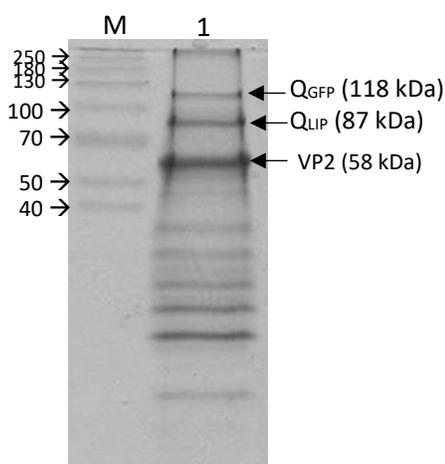


Figura 24. Caracterización de partícula multifuncional 2 [VP2 60% - (Q<sub>LIP</sub>+ Q<sub>GFP</sub>) 40 %] por SDS-PAGE en el que se observa la presencia de Q<sub>LIP</sub>, Q<sub>GFP</sub> y VP2. El patrón regular de bandas que muestran un tamaño menor a los 50 kDa sugiere que se tratan de bandas de degradación.

### 6.5.1 Replegamiento del dominio de afinidad glutation-s-transferasa de Q<sub>GFP</sub>

Como se describió anteriormente, la Q<sub>GFP</sub> no presentó unión con su respectiva columna de afinidad (GSTrap). Lo primero que se verificó fue la integridad del dominio de afinidad GST mediante tratamiento con protocolos de replegamiento. En las figuras 25 y 26 se muestra un SDS-PAGE de las fracciones recolectadas de la purificación de Q<sub>GFP</sub> utilizando la columna GSTrap HP de acuerdo con lo descrito en la sección de métodos. En la figura 25 se muestra una purificación no exitosa de Q<sub>GFP</sub> ya que en las fracciones correspondientes a la elución no se observa presencia alguna de la proteína de interés ni de unión inespecífica de otras proteínas. Se obtuvo un resultado similar con Q<sub>GFP</sub> en amortiguador de almacenamiento y posteriormente dializada contra amortiguador de replegamiento (no mostrado), lo cual apoya la observación de Tao y colaboradores (2010) de que la GST es muy sensible a la presencia de agentes desnaturizantes.

Por otro lado, en la figura 26 se muestran las fracciones de la purificación de cuerpos de inclusión de Q<sub>GFP</sub> resuspendidos en amortiguador de replegamiento. Se observa claramente que en la que las fracciones que corresponden a la elución se obtiene una banda prominente correspondiente a la Q<sub>GFP</sub> además de gran cantidad de impurezas.

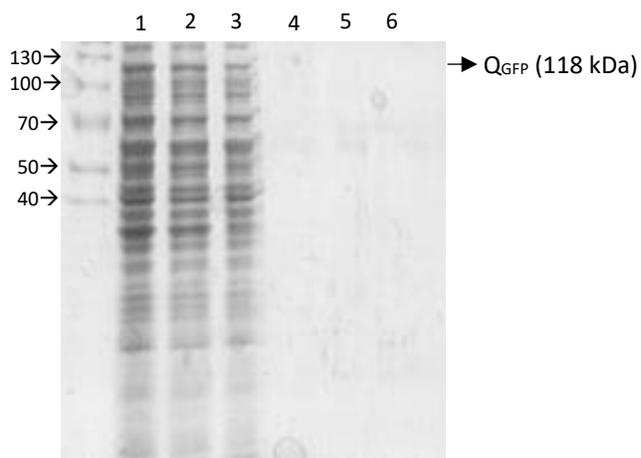


Figura 25. SDS-PAGE de fracciones de purificación de Q<sub>GFP</sub> utilizando columna GSTrap. Q<sub>GFP</sub> sin purificar (1). Q<sub>GFP</sub> no unida a la columna (2). Lavados de columna (3-4). Elución (5-6).

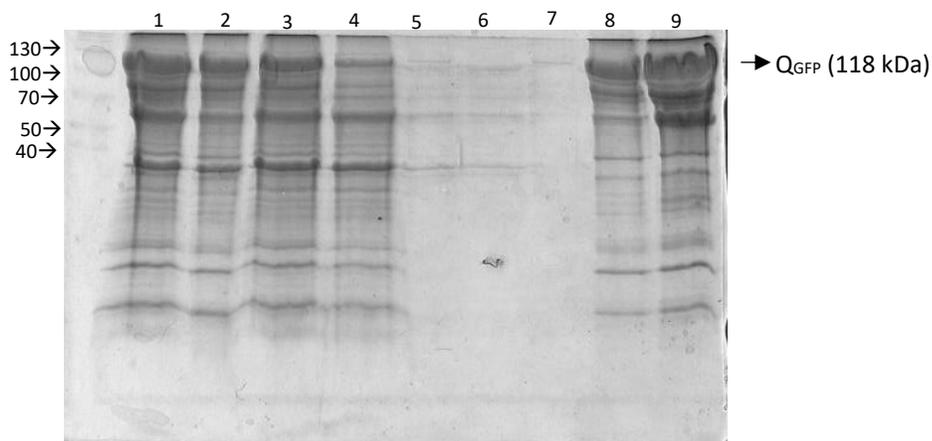


Figura 26. SDS-PAGE de fracciones de purificación de Q<sub>GFP</sub> utilizando columna GSTrap tras protocolo de replegamiento. Q<sub>GFP</sub> sin purificar (1). Q<sub>GFP</sub> no unida a la columna (2-4). Lavados de columna (5-7). Elución (8-9).

## 6.6 CARACTERIZACIÓN DE LAS VLPs

### 6.6.1 Aislamiento de VLPs por cromatografía de exclusión molecular

En la figura 27 se muestra un cromatograma característico de muestras de VLPs que incluyen al menos una de las proteínas quiméricas. El tiempo de retención promedio donde se presenta el máximo de absorbancia es de 70 min, estas fracciones albergan a tres poblaciones de partículas. En la sección 1 se concentran partículas de diámetro de  $\sim 40$  nm, en la sección 2 se concentran VLPs de tamaño teórico adecuado de  $\sim 25$  nm mientras que en la sección 3 se encuentran especies intermediarias de tamaño de  $\sim 17$  nm. Entre los minutos 40 y 50 se concentran agregados de tamaño igual o mayor a los 50 nm. Los diámetros de las poblaciones de partículas fueron medidos por DLS. La sección 2 fue utilizada para los pasos subsiguientes.

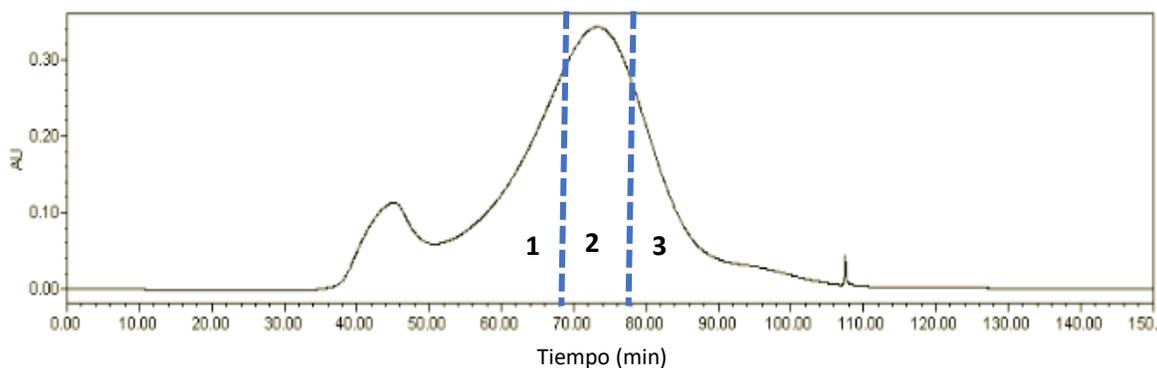


Figura 27. Cromatografía de filtración en gel característica de muestras de VLPs que incluyen al menos una de las proteínas quiméricas. Se resaltan secciones 1, 2 y 3 que concentran partículas de distintos diámetros (ver texto).

## 6.6.2 Determinación de tamaño de partícula por dispersión dinámica de luz (DLS)

En la figura 28 se muestran los análisis de distribución de tamaño por DLS de las partículas formadas a partir de las distintas quimeras. Las muestras fueron purificadas previamente por cromatografía de exclusión molecular. En la tabla 6 se resumen los diámetros obtenidos por esta técnica.

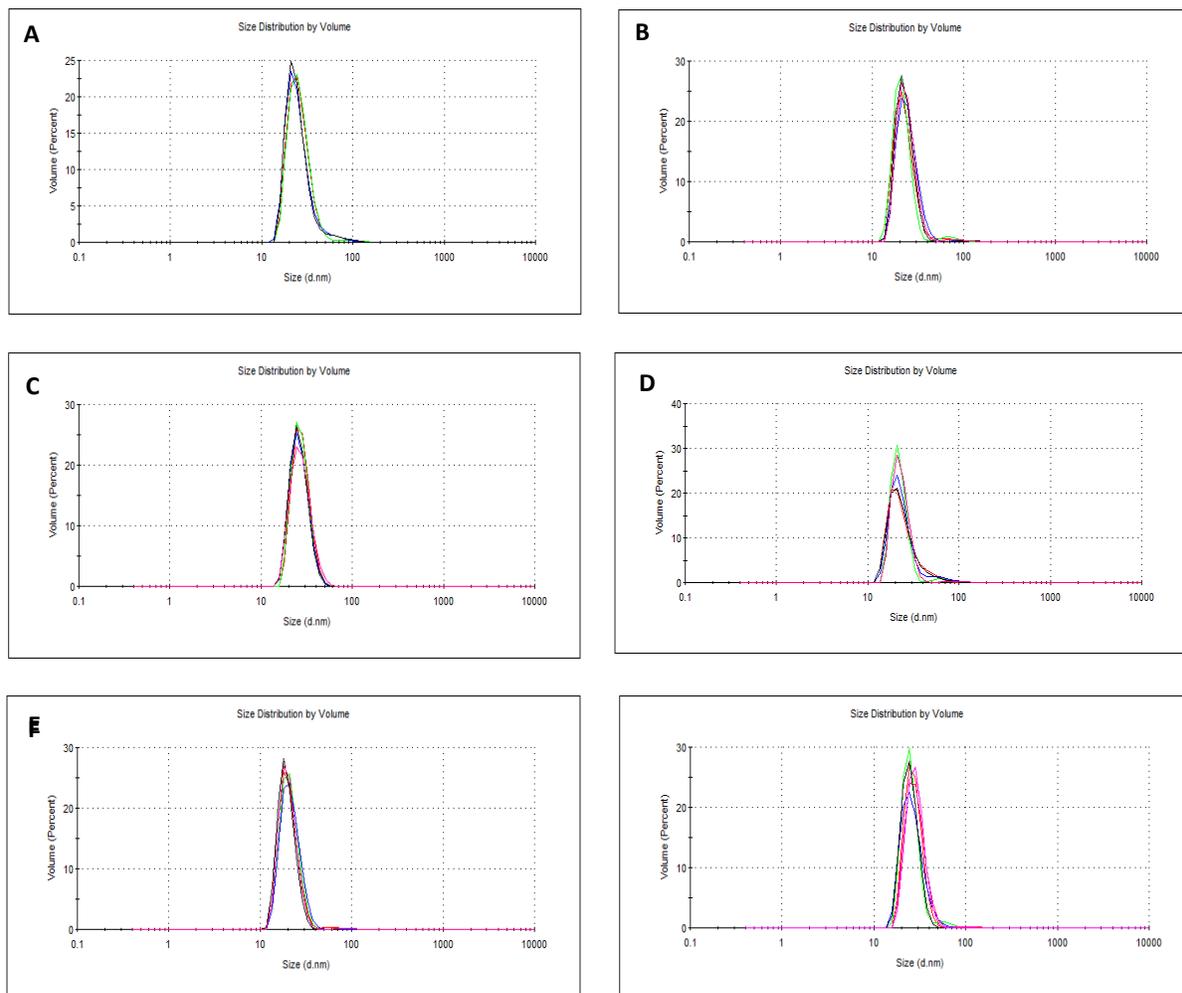
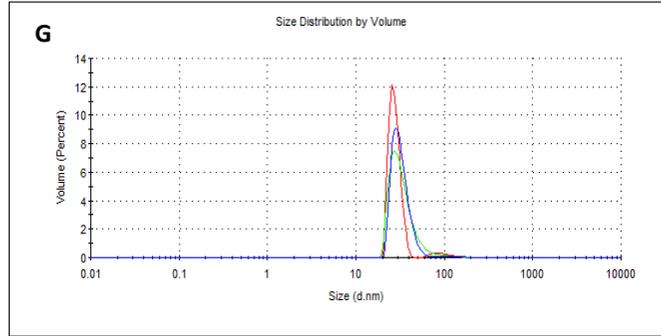


Figura 28. Dispersión dinámica de luz de VLPs purificadas por cromatografía de exclusión molecular. A. VP2 100% B. Q<sub>GFP</sub> 25% (VP2 75%) C. Q<sub>DHFR</sub> 25% (VP2 75%) D. Q<sub>LIP</sub> 25% (VP2 75%) E. Q<sub>GLU</sub> 25% (VP2 75%) F. Q<sub>GFP</sub> 12.5% Q<sub>LIP</sub> 12.5% (VP2 75%) G. Q<sub>GLU</sub> 12.5% Q<sub>LIP</sub> 12.5% (VP2 75%).



Continuación de figura 28. Dispersión dinámica de luz de VLPs purificadas por cromatografía de exclusión molecular. A. VP2 100% B. Q<sub>GFP</sub> 25% (VP2 75%) C. Q<sub>DHFR</sub> 25% (VP2 75%) D. Q<sub>LIP</sub> 25% (VP2 75%) E. Q<sub>GLU</sub> 25% (VP2 75%) F. Q<sub>GFP</sub> 12.5% Q<sub>LIP</sub> 12.5% (VP2 75%) G. Q<sub>GLU</sub> 12.5% Q<sub>LIP</sub> 12.5% (VP2 75%).

En la figura 29 se muestran los análisis por DLS de las VLPs multifuncionales aisladas por cromatografía de afinidad utilizando sus dominios de afinidad distintivos.

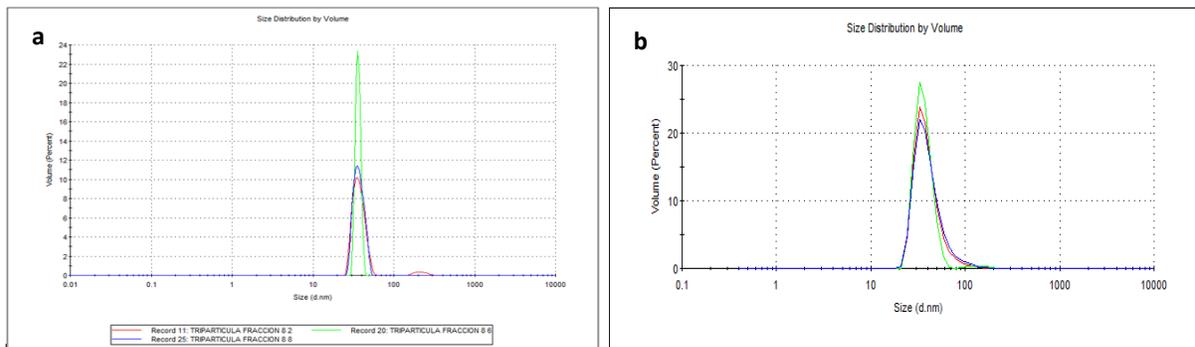


Figura 29. Dispersión dinámica de luz de VLPs aisladas por cromatografía de afinidad. A. Partícula multifuncional 1 [VP2 75% - (Q<sub>LIP</sub>+ Q<sub>GLU</sub>) 25%]. B. Partícula multifuncional 2 [VP2 60% - (Q<sub>LIP</sub>+ Q<sub>GFP</sub>) 40].

Tabla 6. Resumen de diámetros obtenidos por DLS de VLPs purificados por columna de exclusión molecular

Muestra	Diámetro
A. VP2 100%	25.9 ± 11.5
B. Q <sub>GFP</sub> 25% (VP2 75%)	22.4 ± 5.7
C. Q <sub>DHFR</sub> 25% (VP2 75%)	27.1 ± 5.6
D. Q <sub>LIP</sub> 25% (VP2 75%)	25.8 ± 7.0
E. Q <sub>GLU</sub> 25% (VP2 75%)	27.7 ± 6.4
F. Q <sub>GFP</sub> 12.5% Q <sub>LIP</sub> 12.5% (VP2 75%)	28.5 ± 6.1
G. Q <sub>GLU</sub> 12.5% Q <sub>LIP</sub> 12.5% (VP2 75%)	27.5 ± 4.0
VP2 75% - (Q <sub>LIP</sub> + Q <sub>GLU</sub> ) 25%*	35.6 ± 3.4
VP2 60% - (Q <sub>LIP</sub> + Q <sub>GFP</sub> ) 40%*	39.94 ± 14.27

\*VLPs aislados mediante cromatografía de afinidad utilizando los dominios de afinidad únicos.

### 6.6.2 Purificación de VLPs por gradientes de cloruro de cesio

La generación de gradientes de CsCl permite separar y purificar las distintas poblaciones de partículas presentes en una muestra en base a su densidad. Sánchez-Rodríguez y colaboradores identificaron dos bandas características en las muestras de VP2 sometidas a un gradiente de CsCl, así mismo caracterizaron exhaustivamente las especies presentes en dichas bandas. La banda superior con aspecto difuso presenta una densidad característica de aproximadamente 1.14 g/mL y está formada por especies intermediarias. Por otro lado, la banda inferior presenta una densidad de aproximadamente 1.25 g/mL y concentra a un conjunto uniforme de VLPs por lo cual es una banda muy definida y claramente observable.

Las figuras 30, 31, 32, 33 y 34 presentan diversas muestras de VLPs separadas por gradiente de CsCl, así como el análisis por SDS-PAGE de las bandas inferiores recuperadas. En la figura 30 se presentan los resultados para las VLPs formadas a partir de únicamente la proteína quimérica, mientras que en las figuras 31, 32 y 33 se observan los resultados para VLPs formadas a partir de VP2 silvestre y distintas proporciones de VP2 quimérica. Finalmente, en la figura 34 se observan los resultados de la formación de la banda en la región de densidad de 1.24 g/mL de VLPs multifuncionales [VP2 60% - (Q<sub>LIP</sub>+ Q<sub>GFP</sub>) 40%\*] aislados mediante cromatografía de afinidad utilizando los dominios de afinidad distintivos.

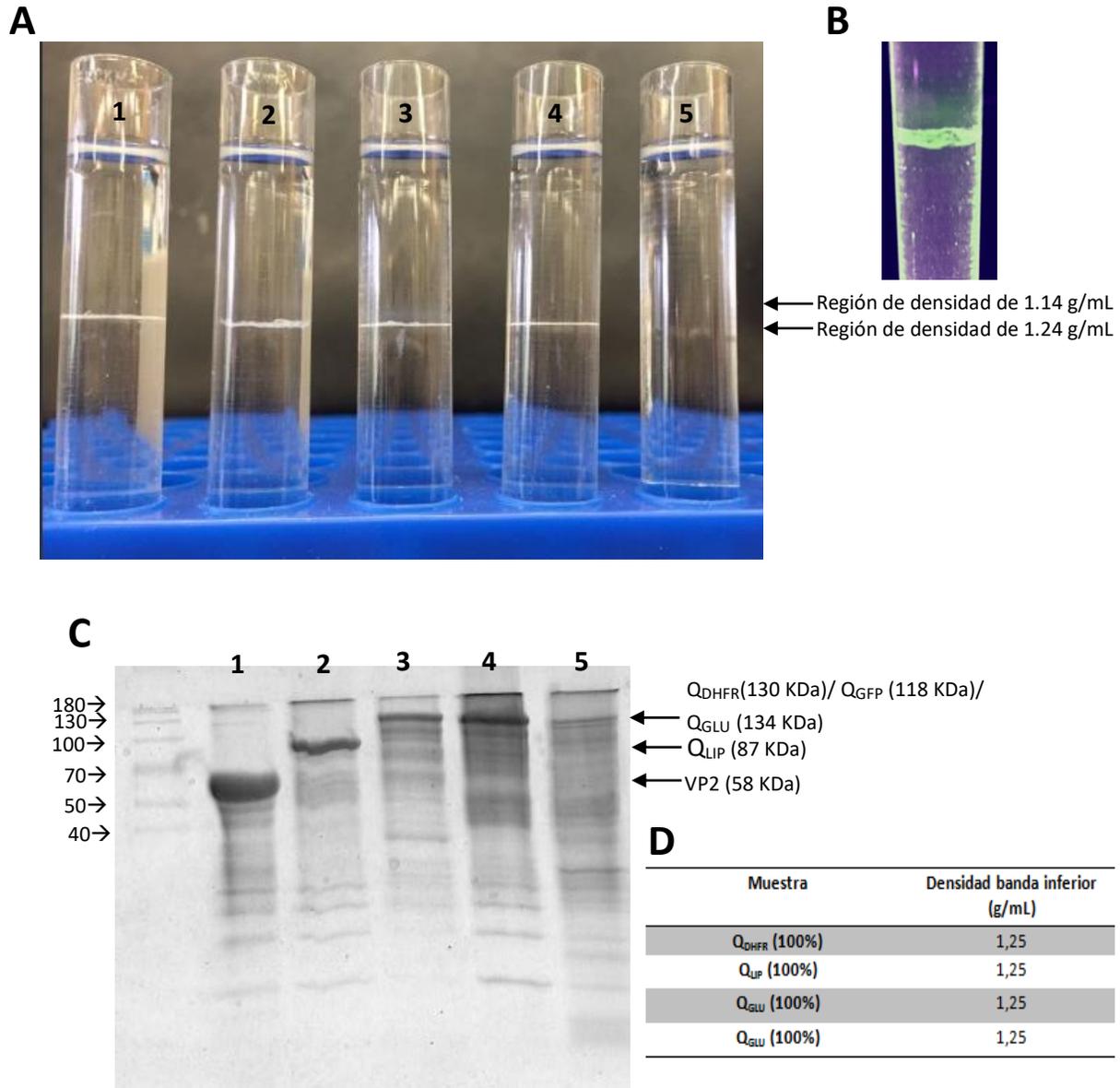
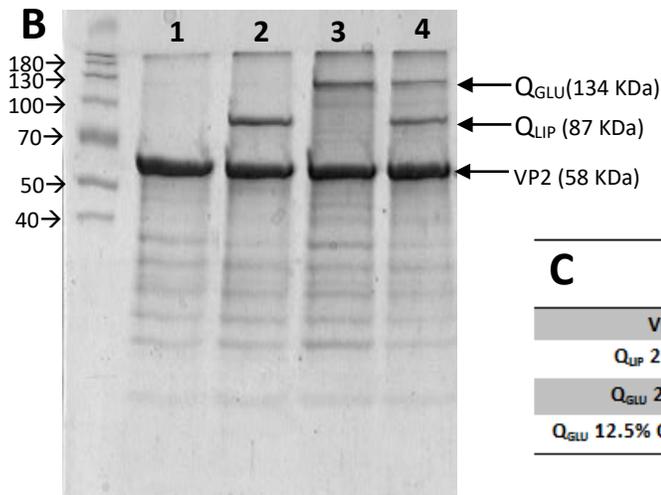
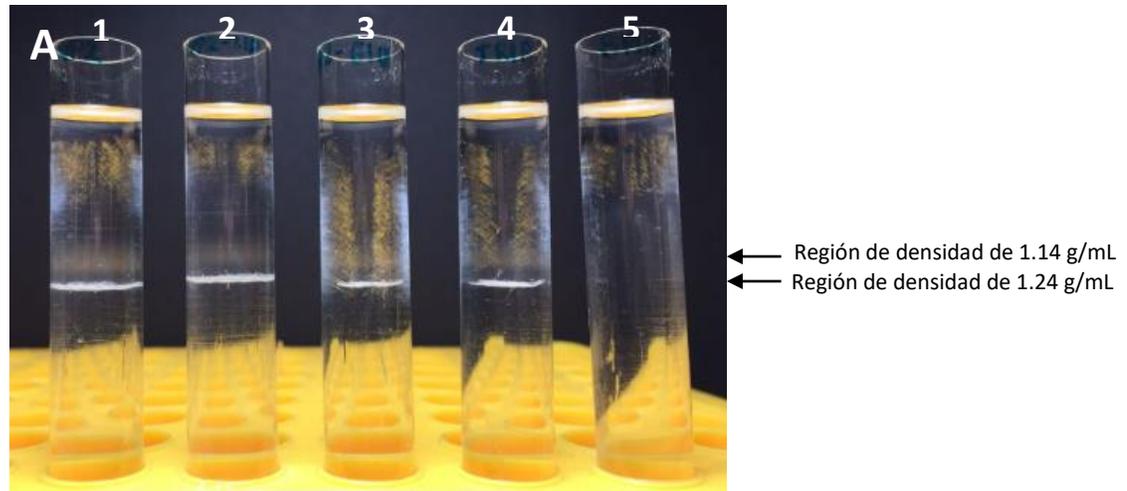


Figura 30. Purificación de VLPs por gradiente de CsCl. A. Patrones de bandas obtenidos tras la formación del gradiente de CsCl; 1. Q<sub>GFP</sub> 100% 2. Q<sub>LIP</sub> 100% 3. Q<sub>DHFR</sub> 100% 4. Q<sub>GLU</sub> 100% 5. CONTROL, amortiguador PBS. B. Fluorescencia del tubo 1 irradiado con luz UV. C. SDS-PAGE de la banda inferior formada tras los gradientes (excepto VP2 en carril 1). 1. VP2 (100%) 2. Q<sub>LIP</sub> 100% 3. Q<sub>GFP</sub> 100% 4. Q<sub>DHFR</sub> 100% 5. Q<sub>GLU</sub> 100% D. Tabla que reúne los valores de densidad de la banda inferior de los gradientes.



Muestra	Densidad banda inferior (g/mL)
VP2 (100%)	1,27
Q <sub>LIP</sub> 25% (VP2 75%)	1,27
Q <sub>GLU</sub> 25% (VP2 75%)	1,26
Q <sub>GLU</sub> 12.5% Q <sub>LIP</sub> 12.5% (VP2 75%)	1,26

Figura 31. Purificación de VLPs por gradientes de CsCl. A. Patrones de bandas obtenidos tras la formación del gradiente de CsCl; 1. VP2 (100%) 2. Q<sub>LIP</sub> 25% (VP2 75%) 3. Q<sub>GLU</sub> 25% (VP2 75%) 4. Q<sub>GLU</sub> 12.5% Q<sub>LIP</sub> 12.5% (VP2 75%) 5. Control, amortiguador PBS<sub>arg</sub>. B. SDS-PAGE de la banda de densidad de 1.24 mg/mL. 1. VP2 (100%) 2. Q<sub>LIP</sub> 25% (VP2 75%) 3. Q<sub>GLU</sub> 25% (VP2 75%) 4. Q<sub>GLU</sub> 12.5% Q<sub>LIP</sub> 12.5% (VP2 75%). C. Tabla que muestra la densidad de la banda inferior de los gradientes.

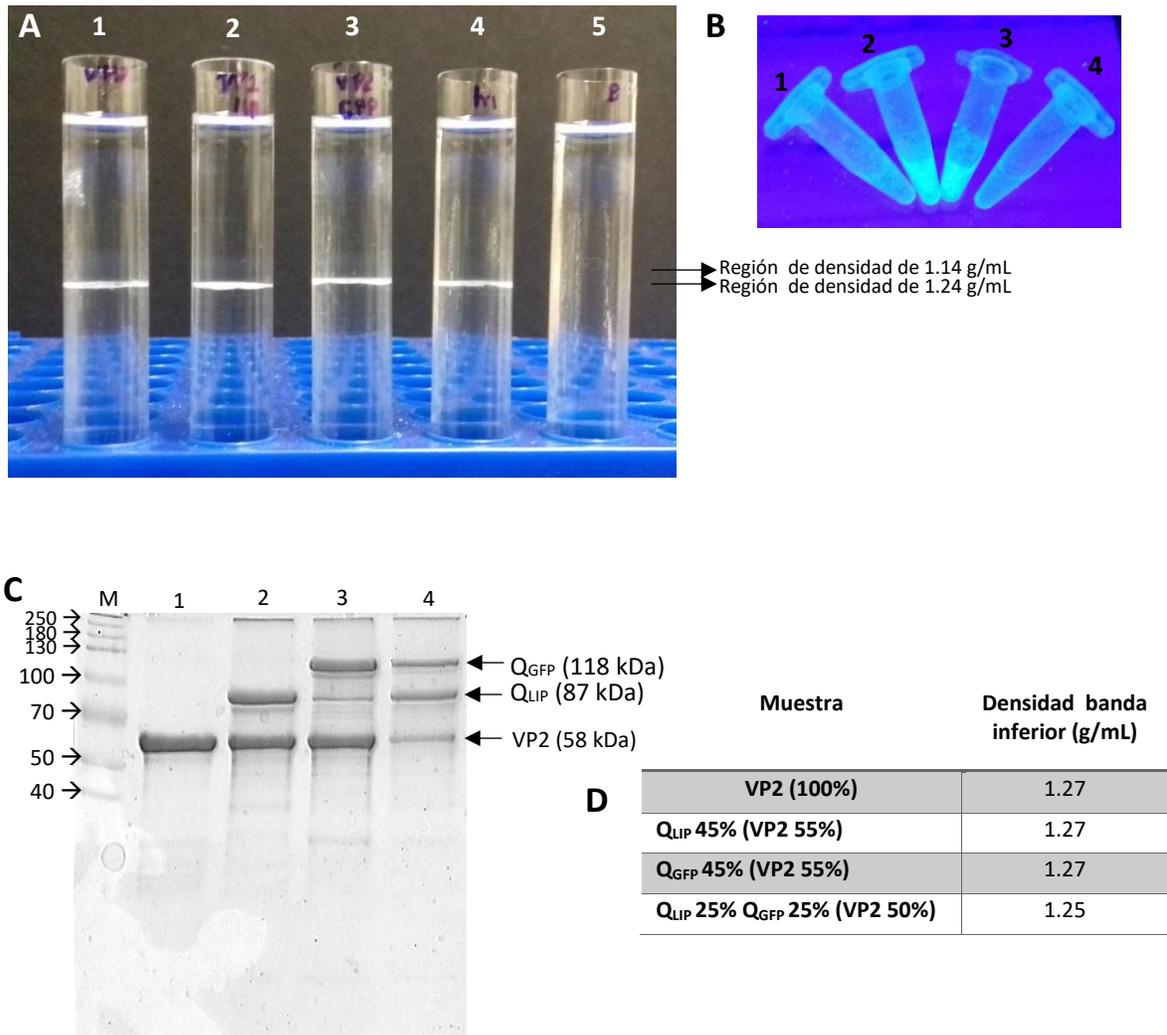


Figura 32. Purificación de VLPs por gradiente de CsCl. A. Patrones de bandas obtenidos tras la formación del gradiente de CsCl; 1. VP2 100% 2. Q<sub>LIP</sub> 45% (55% VP2) 3. Q<sub>GFP</sub> 45% (55% VP2) 4. Q<sub>LIP</sub> (25%) Q<sub>GFP</sub> (25%) VP2 (50%). 5. CONTROL, amortiguador PBS. Para los paneles B y C los números de muestra concuerdan con el número asignado a los tubos de gradientes de CsCl B. Fluorescencia de las bandas recuperadas del gradiente de CsCl 3 y 4 al ser irradiadas con luz UV. C. SDS-PAGE de las bandas inferiores. D. Tabla que reúne la densidad de la banda inferior de los gradientes.

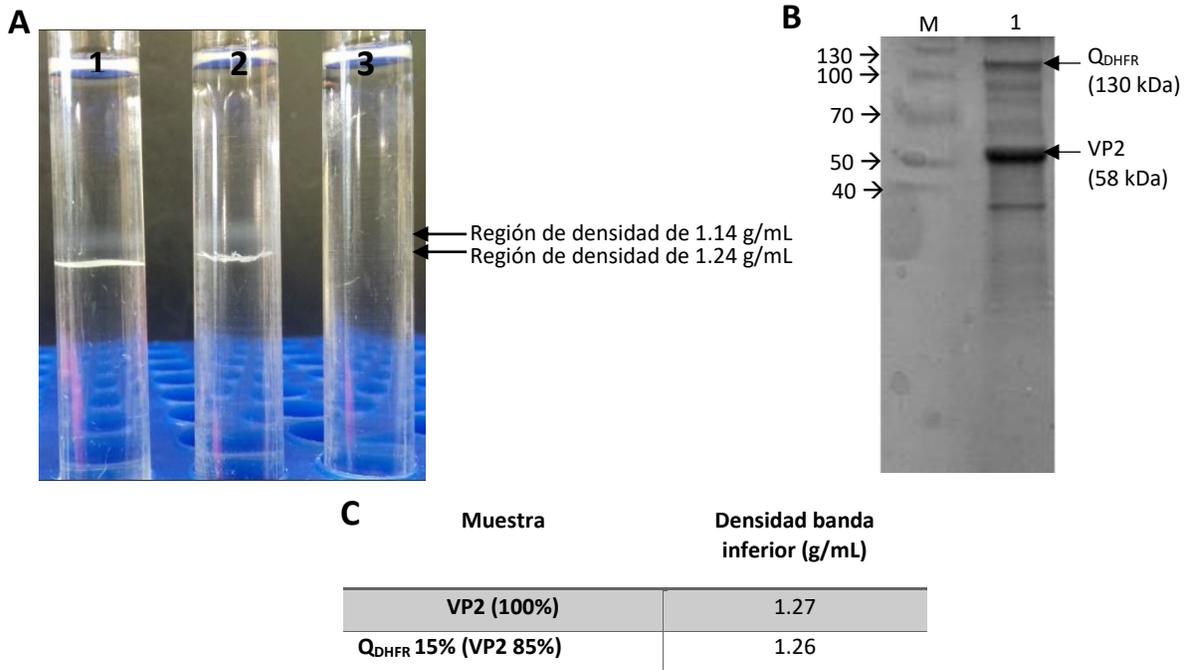


Figura 33. Purificación de VLPs por gradiente de CsCl. A. Patrones de bandas obtenidos tras la formación del gradiente de CsCl; 1. VP2 100% 2. Q<sub>DHFR</sub> 15% (85% VP2) 3. CONTROL, amortiguador PBS. C. SDS-PAGE de la banda inferior del tubo 2. C. Tabla que reúne la densidad de la banda inferior de los gradientes.

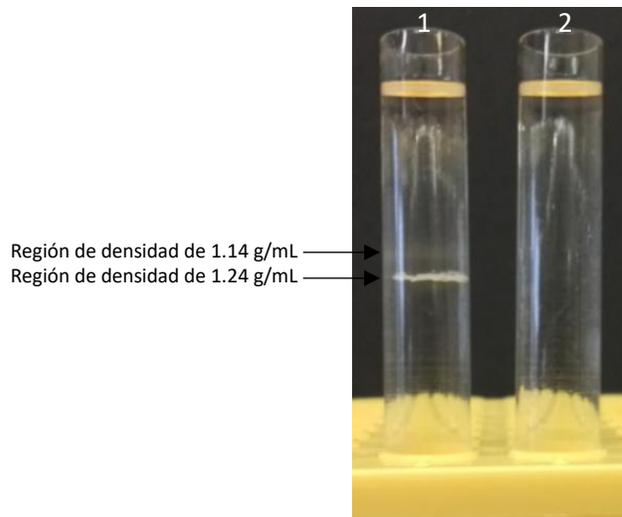


Figura 34. Purificación de VLPs por gradiente de CsCl de 1. VLPs [VP2 60% - (Q<sub>LIP+</sub> Q<sub>GFP</sub>) 40 %] 2. CONTROL, amortiguador PBS.

#### 6.6.4 Caracterización de VLPs por microscopía de fuerza atómica (AFM)

En la figura 35 se muestran las micrografías obtenidas. En la tabla 7 se resumen los diámetros obtenidos por esta técnica. Las VLPs formadas por proteínas quiméricas mostraron un diámetro mayor a las VLPs formadas por VP2 silvestre lo cual es un indicativo de la exposición de las proteínas de fusión en la superficie de las partículas. En el panel E y F muestran protuberancias orientadas hacia la misma dirección lo cual podría deberse a impurezas o bien imperfecciones presentes en la sonda utilizada en el microscopio de fuerza atómica, por lo que el diámetro puede ser menos preciso.

Tabla 7. Diámetros de distintas VLPs obtenidas por AFM

Muestra	Diámetro (nm)
<b>VP2</b>	$22.5 \pm 0.7$
<b>VP2 -Q<sub>GLU</sub> (25%)</b>	$30.9 \pm 4.0$
<b>VP2-Q<sub>LIP</sub> (25%)</b>	$29.0 \pm 4.1$
<b>VP2-Q<sub>DHFR</sub> (25%)</b>	$35.5 \pm 3.5$
<b>VP2-Q<sub>GFP</sub> (25%)</b>	$32.0 \pm 2.1$
<b>VP2- (Q<sub>LIP</sub>+ Q<sub>GLU</sub>) (25%)</b>	$24.8 \pm 2.7$
<b>VP2- (Q<sub>LIP</sub>+ Q<sub>GFP</sub>) (25%)</b>	$34.6 \pm 3.4$

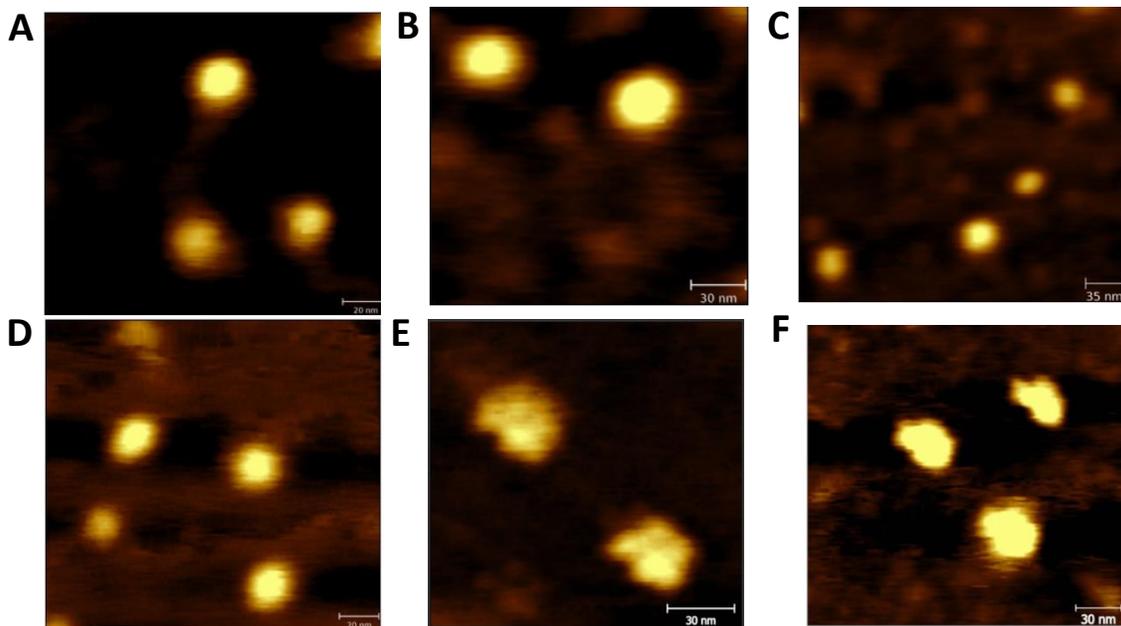


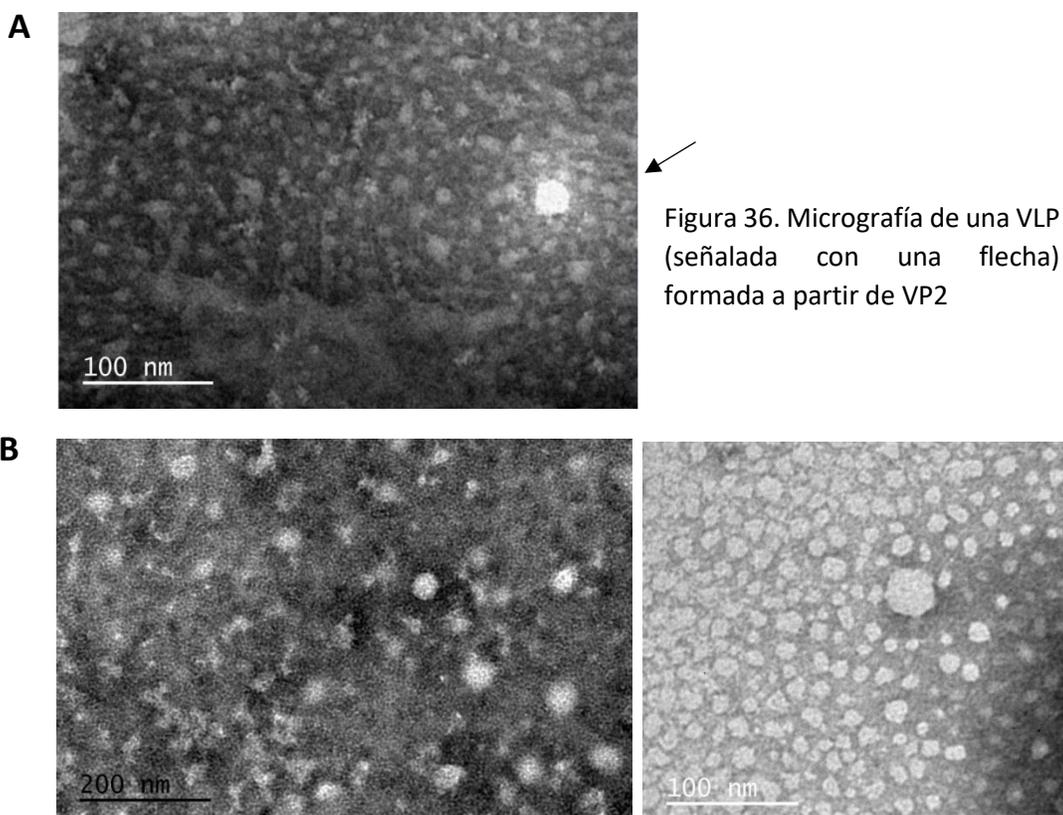
Figura 35. Micrografías obtenidas por microscopía de fuerza atómica de VLPs. A. VP2 B. VP2 - Q<sub>GLU</sub> (25%) C. VP2 -Q<sub>LIP</sub> (25%) D. VP2- (Q<sub>LIP</sub>+ Q<sub>GLU</sub>) (25%) E. VP2 -Q<sub>GFP</sub> (25%) F. VP2- (Q<sub>LIP</sub>+ Q<sub>GFP</sub>) (25%).

### 6.6.5 Caracterización de VLPs por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

En las figuras 36 y 37 se muestran micrografías obtenidas por microscopía de transmisión electrónica. El panel A corresponde a una muestra no homogénea de partículas formadas a partir de VP2 mientras que en el panel B a diferentes tomas de lo que podrían ser VLPs conformadas por VP2- (Q<sub>LIP</sub>+Q<sub>GFP</sub>) (25%). Los diámetros obtenidos por esta técnica, que se resumen en la tabla 8, concuerdan con los diámetros obtenidos por microscopía de fuerza atómica. Para obtener un diámetro preciso sería necesario contar con una población homogénea mayor.

Tabla 8. Diámetros de distintas VLPs obtenidas por TEM.

Muestra	Diámetro (nm)
VP2	24.1
VP2- (Q <sub>LIP</sub> + Q <sub>GFP</sub> ) (25%)	36.1 ± 4.1



### 6.6.6 Medición de actividad/fluorescencia de las VLPs

La actividad específica (U) de  $Q_{LIP}$ ,  $Q_{GLU}$  y  $Q_{DHFR}$  se resumen en la tabla 9.  $Q_{DHFR}$  no mostró actividad medible incluso tras la aplicación del protocolo de replegamiento de Tao y colaboradores (2010).

Por otro lado, en la tabla 10 se detalla el cálculo de la actividad específica de  $Q_{LIP}$  y  $Q_{GLU}$ . Ambas quimeras comparten al 4-NP como producto de hidrólisis. Sin embargo, la longitud de onda utilizada para medir el cambio de absorbancia es ligeramente distinta (410 nm y 405 nm, respectivamente). Para relacionar la absorbancia del 4-NP generado durante el curso de la reacción con su concentración, se realizaron las curvas patrón que se muestran en la figura 38 para longitudes de onda de 405 y 410 nm, de cuyas pendientes se obtiene la absortividad molar. Para la cuantificación de proteína se utilizó una curva patrón de BSA que abarcó las concentraciones de proteína utilizadas.

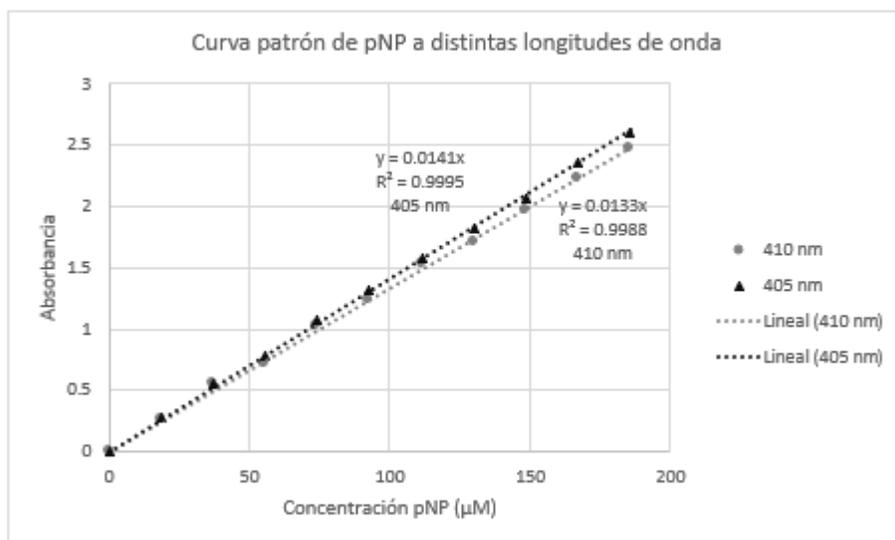


Figura 38. Curva patrón de pNP medido a distintas longitudes de onda.

Tabla 9. Resumen de actividades de  $Q_{LIP}$ ,  $Q_{GLU}$  y  $Q_{DHFR}$

muestra		sustrato	[sustrato] (mM)	$\frac{U}{[enzima]} \left[ \frac{U}{mg} \right]$	$\frac{U}{sitio\ cat} \left[ \frac{U}{\mu mol_{sitio\ cat}} \right]$
$Q_{LIP}$	$Q_{LIP}$ 100%	pNPA	0.20	$0.100 \pm 0.003$	$8.64 \pm 0.23$
	$Q_{LIP}$ 40% VP2- $Q_{LIP}$ -QGFP		0.20	$0.179 \pm 0.011$	$15.57 \pm 1.00$
$Q_{GLU}$	$Q_{GLU}$ 100%	pNPG	10.10	$1.330 \pm 0.040$	$178.51 \pm 5.67$
	$Q_{GLU}$ 25%		10.10	NP	NP
	$Q_{GLU}$ 15% VP2- $Q_{GLU}$ - $Q_{LIP}$		10.10	NP	NP
$Q_{DHFR}$ 100%		DHF/ NADPH	0.05/0.06	NP	NP

\*NP=No presentó actividad con respecto al blanco

Tabla 10. Cálculo de actividad específica para  $Q_{LIP}$  y  $Q_{GLU}$ . El resumen se muestra en la tabla 9.

Muestra	$\bar{v}_i^* \left[ \frac{Abs}{min} \right]$	$\epsilon^{**} \left[ \frac{1}{\mu mol} \right]$	$U = \frac{\bar{v}_i}{\epsilon} \left[ \frac{\mu mol}{min} \right]$	$U_{4-NP} \left[ \frac{\mu mol}{min} \right]$	$U_2 = U - U_{4-NP} \left[ \frac{\mu mol}{min} \right]$
$Q_{LIP}$ 100%	0.038	13.300	$2.828 \times 10^{-3}$	$1.538 \times 10^{-3}$	$1.280 \times 10^{-3}$
$Q_{LIP}$ 40% VP2- $Q_{LIP}$ -QGFP	0.017	13.300	$1.282 \times 10^{-3}$	$4.166 \times 10^{-4}$	$8.66 \times 10^{-4}$
$Q_{GLU}$ 100%	0.193	14.100	$1.369 \times 10^{-2}$	$7.640 \times 10^{-6}$	$1.369 \times 10^{-2}$

\*Promedio de tres repeticiones \*\*Absortividad molar considerada para 1000  $\mu$ L. U=velocidad de reacción expresada en  $\mu$ mol de producto por minuto,  $U_{4-NP}$ =velocidad de hidrólisis espontánea de reactivo, se expresa en  $\mu$ mol de producto por minuto,  $U_2$ = Velocidad de reacción corregida considerando hidrólisis espontánea de reactivo.

Tabla 10 (continuación)

Muestra	$U_2 \left[ \frac{\mu mol}{min} \right]$	[enzima][mg]	$\frac{U}{[enzima]} \left[ \frac{\mu mol}{min\ mg} \right]$	$\frac{U}{sitio\ cat} \left[ \frac{\mu mol}{min\ \mu mol_{sitio\ cat}} \right]$
$Q_{LIP}$ 100%	$1.280 \times 10^{-3}$	0.013	$0.100 \pm 0.003$	$8.64 \pm 0.23$
$Q_{LIP}$ 40% VP2- $Q_{LIP}$ -QGFP	$8.66 \times 10^{-4}$	0.005	$0.179 \pm 0.011$	$15.57 \pm 1.00$
$Q_{GLU}$ 100%	$1.369 \times 10^{-2}$	0.010	$1.334 \pm 0.004$	$178.51 \pm 5.67$

### Determinación cuantitativa de fluorescencia de $Q_{GFP}$

En la figura 39 se muestra los espectros de emisión normalizados para  $Q_{GFP}$  y para VLPs formadas a partir de distintas proporciones  $Q_{GFP}$ . En la tabla 11 se presentan los valores del máximo de emisión de dichas muestras, así como su centro espectral de masa (SCM) calculado de acuerdo con la ecuación 1, donde  $IF_i$  es la intensidad de fluorescencia y  $\lambda_i$  es la longitud de onda correspondiente.

$$SCM = \frac{\sum(IF_i * \lambda_i)}{\sum IF_i} \quad \text{Ecuación 1}$$

<b>Tabla 11. Resumen de valores de longitud de onda de máximo de emisión y SCM</b>		
<b>Muestra</b>	<b>Longitud de onda de máximo de emisión (nm)</b>	<b>SCM (nm)</b>
<b>GFP 100%</b>	513	518
<b>VP2-Q<sub>GFP</sub> (5%)-Q<sub>LIP</sub></b>	514	519
<b>VP2-Q<sub>GFP</sub> (25%)</b>	514	525

La muestra de VP2-Q<sub>GFP</sub> (25%) mostró la mayor variación en el SCM lo cual podría atribuirse a la mayor interacción entre dominios homólogos de Q<sub>GFP</sub> los cuales se incrementan al estar presente dichos dominios únicamente. En sistemas de VLPs fluorescentes similares (Bustos-Jaimes et al., 2017) se han descrito cambios en el espectro de emisión de que fueron atribuidos a ligeros cambios estructurales ocasionados por la inmovilización enzimática.

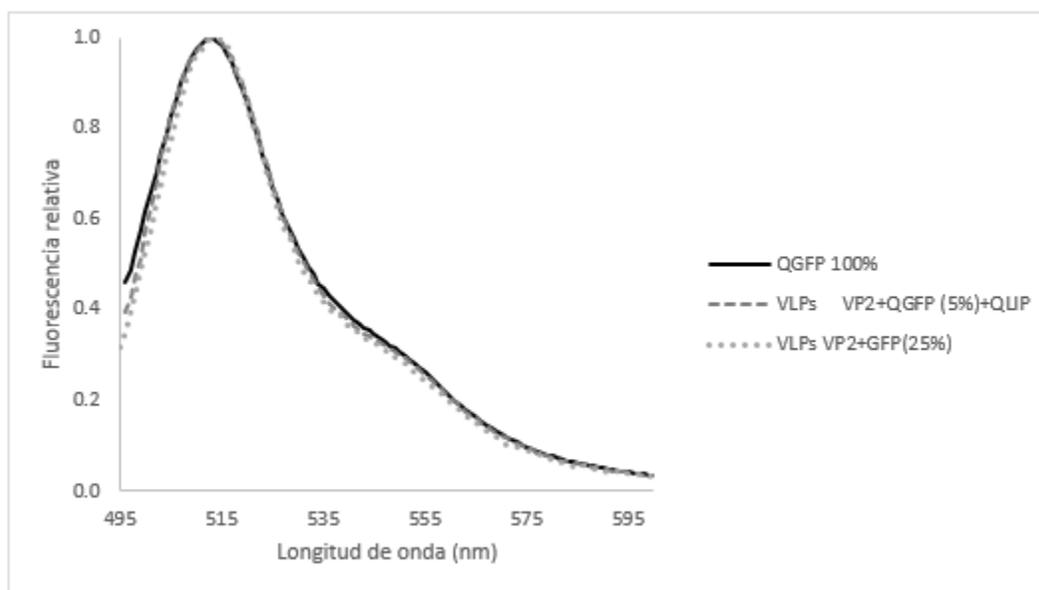


Figura 39. Espectro de emisión de fluorescencia normalizado de Q<sub>GFP</sub> (línea continua), VLPs formados por VP2-Q<sub>GFP</sub>(5%)-Q<sub>LIP</sub> (línea discontinua con guiones) y VLPs formados por VP2-Q<sub>GFP</sub>(25%) (línea discontinua con puntos).

## 7. DISCUSIÓN

La formación de una partícula multifuncional aislada mediante cromatografía de afinidad es una aproximación importante hacia la creación de partículas complejas que requirió de la exploración de distintos sistemas conformados por VP2, Q<sub>LIP</sub>, Q<sub>DHFR</sub>, Q<sub>GFP</sub> y Q<sub>GLU</sub>, para finalmente llegar a evaluar la factibilidad de dos sistemas multifuncionales constituidos por VP2-Q<sub>LIP</sub>-Q<sub>GLU</sub> y VP2-Q<sub>LIP</sub>-Q<sub>GFP</sub>.

Se obtuvieron cuatro proteínas quiméricas de VP2 (Figura 12, 19) que incluyeron una proteína de interés (lip, GFP,  $\alpha$ -glu o DHFR) así como un dominio de afinidad único en el extremo N-terminal (CBP, GST, ST y MBP, respectivamente). Entre cada dominio se incorporó una región espaciadora constituida por 11 residuos de glicina y serina intercalados, que permitió conferir movilidad a los dominios. Justo después de la primera región espaciadora (N $\rightarrow$ C) se incorporó un sitio de reconocimiento para la proteasa TEV que permitiría retirar el dominio de afinidad una vez que éste ya no fuese necesario y así aumentar la exposición de la proteína de interés. Cabe mencionar que, en este trabajo, no se llevó a cabo la proteólisis del dominio.

Existen diversos trabajos en los que se ha demostrado que el extremo N-terminal de la proteína VP2 del parvovirus B19 es un candidato idóneo para la fusión de proteínas recombinantes ya que dicha fusión no compromete el ensamblaje de las partículas tipo virus, y además dicho extremo (y aquello unido a éste) puede encontrarse expuesto al disolvente a través del poro formado en el eje de orden 5 (Gilbert et al., 2005; Amexis et al., 2006; Ogasawara et al., 2006; Morán-García et al., 2016). A diferencia del extremo N-terminal, la mayoría de los 50 residuos del extremo C-terminal de VP2 se encuentran accesibles en la superficie de la partícula, excepto por los cuatro aminoácidos finales que se encuentran internalizados en la cápside (Kaufmann et al., 2004). En los viriones naturales compuestos por VP1 y VP2, la presencia de una región única en el extremo N-terminal de VP1 que la hace diferenciarse de VP2, indica que dicho extremo puede ser sujeto a modificaciones sin afectar el plegamiento de la región de VP1 que es idéntica a VP2 (Amexis et al., 2006; Ogasawara et al., 2006).

El grado de exposición de las proteínas fusionadas en el extremo amino terminal puede variar de un sistema a otro. Por ejemplo, Morán-García y colaboradores (2016) encontraron que 35% de las proteínas fusionadas se encuentran expuestas en la superficie de las partículas, mientras que Gilbert y colaboradores (2005) determinaron que en promedio 9 dominios de eGFP eran desplegados al exterior de las VLPs. En ambos casos, solo una fracción de los extremos N-terminales quedan

expuestos en la superficie de las VLPs. En contraste, la inclusión de proteínas heterólogas en asas superficiales es una estrategia que ha permitido solucionar el problema del grado de exposición variable (Santillán-Uribe et al., 2015; Bustos-Jaimes et al., 2017).

En este trabajo, la subclonación de los fragmentos GST-GFP, MBP-DHFR, CBP-LIP y ST-GLU en el vector de expresión pET22b-L-VP2, utilizando técnicas de ingeniería genética, permitió la obtención de genes quiméricos y sus respectivas proteínas quiméricas. Este es un camino alternativo a la conjugación química, que ha sido usada ampliamente para la adición de elementos heterólogos en la superficie de VLPs. La ventaja es que los pasos requeridos para la conjugación no son necesarios.

Para la purificación de las proteínas se realizaron adecuaciones para cada una de las quimeras. Se buscó optimizar el protocolo seguido en trabajos anteriores con quimeras similares (Bustos-Jaimes et al., 2017), de manera que se pudiese obtener un alto grado de pureza, rendimiento y conservación de la actividad catalítica/fluorescencia. En general, se observó que a mayor concentración de GuHCl utilizado para solubilizar los cuerpos de inclusión (así como durante el proceso de purificación) se obtenía mayor rendimiento y pureza, sacrificando en algunos casos la integridad de la enzima de interés. Tal es el caso de la  $\alpha$ -glucosidasa que se mostró especialmente sensible a altas concentraciones de agente desnaturante, razón por la cual ésta se purificó utilizando concentraciones menores de GuHCl (4 M) e imidazol durante los lavados de columna (afinidad a  $\text{Ni}^{2+}$ ). Estos factores repercutieron negativamente en la pureza final de la muestra (Figura 22, carril 5). Se piensa que el grado de exposición de la etiqueta de afinidad aumenta (por el grado de desnaturación de la proteína) a medida que la concentración de agente desnaturante aumenta lo cual es directamente observable en el incremento en la afinidad de la proteína por la columna.

Se exploraron métodos alternativos de purificación de proteína (resultados no mostrados) como lo es la purificación por cromatografía de afinidad en condiciones no desnaturantes utilizando el dominio de afinidad particular de cada quimera, así como filtración en gel. Tras la separación de las muestras por SDS-PAGE se observó un bandeo similar al de la muestra sin purificar lo cual indica que hay gran cantidad de especies que están interaccionando de manera inespecífica con intermediarios/partículas formadas, tanto como en el interior como en el exterior.

La pureza de la muestra es un factor importante para el proceso de ensamble y para su análisis. La presencia de impurezas disminuye el rendimiento del ensamble al generar gran cantidad de especies intermediarias ya que la probabilidad de interacción de las moléculas que conforman la cápside

disminuye al aumentar la concentración de otras proteínas. Además, dichas impurezas podrían llegar a interactuar con las proteínas de interés durante el repliegamiento y así modificar su estructura, o bien, podrían interactuar con los capsómeros ya ensamblados y evitar su participación en la formación de cápsides. Sin embargo, en sistemas similares de VLPs basados en el parvovirus B19 (Bustos-Jaimes et al., 2017) se demostró que es posible obtener partículas tipo virus a partir de cuerpos de inclusión parcialmente puros, lo cual indica que la presencia de impurezas no compromete de manera significativa la competencia de las proteínas para formar cápsides.

Utilizando métodos fisicoquímicos como análisis por DLS (Figuras 28 y 29), separación por centrifugación isopícnica (Figuras 30-34), cromatografía de exclusión molecular (Figura 27) y AFM (Figura 35), se lograron caracterizar VLPs conformadas por VP2 y las distintas quimeras, lo cual daría indicios de cuales de las proteínas quiméricas podrían ser utilizadas para formar la partícula multifuncional. Mediante purificaciones en condiciones no desnaturalizantes, se verificó el plegamiento adecuado del dominio de afinidad y, con ensayos de actividad/fluorescencia, la integridad de las proteínas quiméricas. En la tabla 12 se resumen las observaciones realizadas.

<b>Tabla 12. Información resumida de quimeras</b>				
	<b>Q<sub>GFP</sub></b>	<b>Q<sub>LIP</sub></b>	<b>Q<sub>DHFR</sub></b>	<b>Q<sub>GLU</sub></b>
<b>Formación de ensamblados (VP2 75% + quimera)</b>	Sí	Sí	Sí	Sí
<b>Formación de ensamblados (100% quimera)</b>	Sí*	Sí*	Sí*	Sí*
<b>Actividad enzimática/ fluorescencia</b>	Sí	Sí	No	No***
<b>Replegamiento del dominio de afinidad</b>	No**	Sí	Sí	Sí

\*Ineficiente: Una pequeña fracción de proteína quimérica forma VLPs

\*\*Se requiere llevar a cabo protocolo de repliegamiento, disminución de eficiencia de ensamblado

\*\*\*1.96 veces menos activa que la enzima nativa

Como se puede observar en la tabla 12, todas las quimeras son capaces de formar partículas tipo virus en presencia de VP2. También existe formación de VLPs conformados únicamente por proteínas quiméricas, aunque este proceso es ineficiente ya que solo una fracción de la proteína quimérica disponible forma VLPs, probablemente debido a problemas de impedimento estérico.

En general, Q<sub>LIP</sub> mostró ser la quimera más prometedora al repliegarse tanto su dominio de afinidad como la lipasa. La actividad de Q<sub>LIP</sub> es equiparable a la reportada por Bustos-Jaimes y colaboradores (2017) para quimeras de VP2 del parvovirus B19 que incluyó a la Lipasa A de *B. pumilus* en el asa

301-313 (Q<sub>LIP</sub>-307) (tabla 13). Tanto Q<sub>LIP</sub> como Q<sub>LIP</sub>-307 mostraron un decremento notorio en la actividad comparada con la lipasa libre (BpIA), lo cual indica que su inmovilización en la superficie de las VLPs afecta el plegamiento o la dinámica conformacional de BpIA.

Tabla 13. Comparación de actividades enzimáticas de especies de BpIA específicas			
Muestra	[sustrato] (mM)	$\frac{U}{\text{sitio cat}} \left[ \frac{U}{\mu\text{mol}_{\text{sitio cat}}} \right]$	$\frac{[U/[\mu\text{mol sitio cat}]]_{BpIANATIVA}}{[U/[\mu\text{mol sit cat}]]_{MUESTRA}}$
BpIA (100%)*	0.5	202.0 ± 0.4	1
Q <sub>LIP</sub> -307 (100%)*	0.5	9.5 ± 1.4	21.3
VP2 (80%) + Q <sub>LIP</sub> -307 (20%)*	0.5	9.7 ± 0.6	20.8
Q <sub>LIP</sub> (100%)	1.0	8.6 ± 0.2	23.5
VP2 (80%) + Q <sub>LIP</sub> (20%) + Q <sub>GFP</sub> (20%)	1.0	15.6 ± 1.0	13.0

\*Información obtenida de Bustos-Jaimes et al., 2017.

En nuestros resultados fue evidente que el dominio de afinidad GST no se replegó correctamente. Este dominio, presente en la quimera Q<sub>GFP</sub>, requirió un protocolo de replegamiento adicional (descrito en la sección de metodología), lo cual disminuyó la eficiencia del ensamble, probablemente debido al efecto desnaturante de los detergentes residuales (resultados no mostrados). El tiempo de diálisis para ensamblar la partícula se duplicó y el rendimiento de la purificación de Q<sub>GFP</sub> utilizando su dominio de afinidad fue bajo (menor a 0.5 mg por ronda de purificación), insuficiente para una unidad de ensamble. Considerando la pérdida de material a través del procedimiento de aislamiento (tabla 3), el protocolo de replegamiento resulta inoperable.

Q<sub>DHFR</sub> no mostró actividad enzimática medible con respecto al blanco según las condiciones descritas en la sección de metodología. Dichas condiciones fueron seleccionadas en base al kit comercial para ensayos de actividad de DHFR de Sigma-Aldrich. El protocolo de replegamiento utilizado para el dominio GST fue extendido a Q<sub>DHFR</sub> sin éxito. Se especula que la falta de actividad es resultado de problemas de plegamiento ya que las condiciones a las que se sometió la enzima generan desnaturación irreversible para la mayoría de las enzimas.

Por otro lado, en la tabla 14 se resumen los valores de actividad específica de diversas especies de  $\alpha$ -glucosidasa de *S. cerevisiae*. En un trabajo anterior (Soto-Valerio, 2017) se trabajó con una quimera de la  $\alpha$ -glucosidasa silvestre ( $\alpha$ -Glu) a la cual le fue añadido un segmento espaciador

seguido de seis histidinas. Este trabajo tuvo como objetivo estudiar la capacidad de re-plegamiento de la  $\alpha$ -Glu-L6H *in vitro* tras la desnaturalización con 6 M de GuHCl. Se determinó que  $\alpha$ -Glu-L6H no podía ser replegada adecuadamente incluso a partir de concentraciones de 0.5 M de GuHCl. La actividad mostrada por  $Q_{GLU}$  es atribuible a que la presencia de dos proteínas que son capaces de replegarse correctamente (VP2 y StrepTag) favorecen a su vez el re-plegamiento de  $Q_{GLU}$  mostrando así la mitad de actividad que la enzima nativa  $\alpha$ -Glu. En la tabla 8 se menciona que la actividad de  $Q_{GLU}$ , en proporciones distintas al 100%, no pudo ser registrada al momento de formar partículas tipo virus, lo que podría ser el resultado aditivo de la localización de la  $\alpha$ -Glu en el interior de la partícula y de su falta de robustez, lo cual podría haber generado modificaciones estructurales durante el proceso de ensamble.

**Tabla 14. Comparación de actividades enzimáticas de especies de  $\alpha$ -Glu específicas con concentración de sustrato saturante**

Muestra	[sustrato] (mM)	$\frac{U}{sitio\ cat} \left[ \frac{\mu mol}{min\ \mu mol\ sitio\ cat} \right]$	$\frac{[U/[\mu mol\ sitio\ cat]]_{\alpha-GLU\ NATIVA}}{[U/[\mu mol\ sit\ cat]]_{MUESTRA}}$
$Q_{GLU}$	10.1	178.51	1.96
$\alpha$ -Glu (*Deng et al. 2014)	10.0	349.90	1.00

\*U/sitio catalítico calculado a partir del valor de U reportado por Deng et al., 2014.

En la figura 39 se muestran los espectros de emisión normalizados de diversas muestras de  $Q_{GFP}$  la cual se considera un sistema prometedor al no perder su fluorescencia tras su exposición a altas concentraciones de GuHCl (5 M).

Tomando en cuenta las observaciones anteriores, se decidió trabajar con los sistemas VP2- $Q_{LIP}$ - $Q_{GLU}$  y VP2- $Q_{LIP}$ - $Q_{GFP}$ , cuyo aislamiento se describe en la tabla 3. Como se menciona en la sección de resultados, el rendimiento del proceso global para obtener VP2- $Q_{LIP}$ - $Q_{GLU}$  es muy bajo (menor al 1%), y aunado a la nula actividad de la  $Q_{GLU}$ , hacen poco factible trabajar con esta población de VLPs. Por otro lado, para el sistema multifuncional 2 conformado por VP2- $Q_{LIP}$ - $Q_{GFP}$  se obtuvo un rendimiento del 12% lo cual permitió analizar la muestra por DLS (Figura 29b), SDS-PAGE (Figura 24), centrifugación isopícnica (Figura 34), AFM (Figura 35, panel F) y TEM (Figura 37) demostrando así que es posible construir VLPs multifuncionales, y que además es posible aislarlas utilizando cromatografía de afinidad.

Sin embargo, quedan puntos importantes en los cuales trabajar, como lo es la caracterización por AFM y TEM. El panel F de la figura 35 se observa una protuberancia con una orientación constante presente en todas las VLPS de VP2-Q<sub>LIP</sub>-Q<sub>GFP</sub> que se atribuye a imperfecciones en la sonda del microscopio o bien a contaminación de la misma. Para el caso del análisis por microscopía electrónica de transmisión, es de especial importancia encontrar una población lo suficientemente grande que permita asegurar que se trata de las partículas de interés.

## 8. CONCLUSIONES

### Conclusión general

Es posible construir una partícula tipo virus multifuncional a partir de VP2, Q<sub>GFP</sub> y Q<sub>LIP</sub>. Así mismo, se comprobó la presencia de las proteínas quiméricas que la constituyen mediante purificación por cromatografía de afinidad y medición de actividad/fluorescencia.

### Conclusiones particulares

- Es posible sobreexpresar las proteínas quiméricas Q<sub>GLU</sub>, Q<sub>GFP</sub>, Q<sub>LIP</sub> y Q<sub>DHFR</sub> utilizando células de *E. coli* (DE3). Dichas proteínas forman cuerpos de inclusión y pueden ser purificadas por cromatografía de afinidad a Ni<sup>2+</sup> en condiciones desnaturalizantes.
- Es factible obtener partículas tipo virus a partir de Q<sub>GLU</sub>, Q<sub>GFP</sub>, Q<sub>LIP</sub> y Q<sub>DHFR</sub> y distintas proporciones de VP2 lo cual demuestra que la fusión de las proteínas recombinantes GST-sfGFP, ST-αGlu, CBP-lipasa A y MBP-hDHFR en el extremo amino terminal de la proteína VP2 no interfiere con la formación de partículas tipo virus.
- Es posible construir VLPs a partir de VP2 y más de una de las proteínas recombinantes Q<sub>GLU</sub>, Q<sub>GFP</sub>, Q<sub>LIP</sub>, Q<sub>DHFR</sub>. Así mismo, la utilización de los dominios de afinidad únicos permite el aislamiento de las partículas que incorporaron a la proteína recombinante de interés.

## 9. EXPECTATIVAS

Tras la evaluación de las quimeras  $Q_{GLU}$ ,  $Q_{GFP}$ ,  $Q_{LIP}$  y  $Q_{DHFR}$  se determinó que las proteínas sfGFP y lipasa de *B. pumilus* GMA1 son adecuadas para formar quimeras con VP2 y ser usadas para la construcción de VLPs. Desafortunadamente el dominio GST elegido para GFP no se repliega adecuadamente tras su exposición a agentes desnaturalizantes como lo es el GuHCl. En nuestro caso, las VLPs del sistema multifuncional 2, conformado por VP2- $Q_{LIP}$ - $Q_{GFP}$ , puede ser purificado por el dominio de afinidad de la quimera  $Q_{LIP}$ , y la población seleccionada en la cromatografía de afinidad presenta fluorescencia, por lo que al menos una fracción de dicha población debe contener a ambas proteínas quiméricas. Para que el total de la población contenga a ambas quimeras se podría usar un dominio de afinidad diferente que se pueda replegar en las condiciones usadas en este trabajo. Nuestros resultados sugieren que una quimera que incluya a la GFP y al dominio de afinidad Strep tendría estas propiedades. Con esta nueva partícula multifuncional se podría estandarizar el protocolo de aislamiento para después escalarlo y obtener suficiente cantidad para realizar las pruebas pertinentes. Esto sería parte de un proyecto en el que el objetivo principal fuese el desarrollo de un proceso de escalamiento.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Alcántara-Sol, M.P (2009) **Caracterización bioquímica de la actividad lipolítica de *Bacillus pumilus* aislado de un producto lácteo tradicional mexicano.** *Tesis de maestría, UNAM.*

Amexis, G. & Young N.S. (2006) **Parvovirus B19 empty capsids as antigen carriers for presentation of antigenic determinants of dengue 2 virus.** *J. Infect. Dis.* 194, 790-794

Aristi U.G. (2002) **Parvovirus B19.** *Rev. Med. Hosp. Gen. Mex.* 65, 30-35

Arpigny, J.L. & Jaeger, K.E. (1999) **Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties.** *Biochem. J.* 343, 177-183

Bagchi, D., Bagchi, M., Moriyama & H., Shahidi, F. (2013) **Bio-Nanotech A revolution in food, biomedical and health sciences.** Oxford. Wiley-Blackwell

Banka. S., Blom, H.,Walter, J., Aziz, M.,Urquhart J.,Clouthier C. M.,Rice, G. I.,Brouwer, A.P. De E., Hilton, E.,Vassallo, G.,Will, A.,Smith, D. E.C.,Smulders, Y. M.,Wevers, R. A.,Steinfeld, R.,Heales, S., Crow Y. J.,Pelletier, J. N.,Jones, S. & Newman, W. G. (2011) **Identification and Characterization of an Inborn Error of Metabolism Caused by Dihydrofolate Reductase Deficiency.** *Am. J. Hum. Genet.* 88, 216-225

Bansal G.P., Hatfield J.A., Dunn F.E., Kramer A.A., Brady F., Riggin C.H., Collett M.S., Yoshimoto K., Kajigaya S. & Young N.S. (1993) **Candidate recombinant vaccine for human B19 parvovirus.** *J. Infect. Dis.* 167, 1034-1044

Bowker, M. (1998) **The Basis and Applications of Heterogeneous Catalysis.** Oxford. Oxford University Press

Bustos-Jaimes, I. (1995) **Aislamiento selectivo de un microorganismo productor de lipasa proveniente de un ambiente extremo.** *Tesis de licenciatura, UNAM*

Bustos-Jaimes, I., Mora-Lugo, R., Calcagno, M.L. & Farrés, A. (2010) **Kinetic studies of Gly28:Ser mutant form of *Bacillus pumilus* lipase: Changes in kcat and thermal dependence.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1804, 2222-2227

Bustos-Jaimes, I., García-Torres, Y., Santillán-Urbe, H.C. & Montiel, C. (2013) **Immobilization and anantioselectivity of *Bacillus pumillus* lipase in ionic liquids.** *J. Mol. Catal. B. Enzym.* 89, 137-141

Bustos-Jaimes, I., Soto-Román, R.A., Gutiérrez-Landa, I.A., Valadez-García, J. & Segovia-Trinidad, C.L. (2017) **Construction of protein-functionalized virus-like particles of parvovirus B19.** *J. Biotechnol.* 263, 55-63

Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V. & Henrissat, B. **The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics.** *Nucleic Acids Res.* 37, D233- D238

Chroboczek, J., Szurgot, I. & Szolajska, E. (2014) **Virus-like particles as vaccine.** *Acta Biochim. Pol.* 61, 531-539

- Cormack, B.P., Valdivia, R.H. & Falkow, S. (1996) **FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)**. *Gene*. 173, 33-38
- Cramer, A., Whitehorn, E.A., Tate, E. & Stemmer, W.P. (1996) **Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling**. *Nat. Biotechnol.* 14, 315-319
- Deng, X., Petitjean, M., Teste, M.A., Kooli, W., Tranier, S., François, J.M. & Parrou J.L. **Similarities and differences in the biochemical and enzymological properties of the four isomaltases from *Saccharomyces cerevisiae***. *FEBS Open Bio*. 4, 200-212
- Enders M., Helbig S., Hunjet A., Pfister H., Reichhuber C. & Motz M. (2007) **Comparative evaluation of two commercial enzyme immunoassays for serodiagnosis of human parvovirus B19 infection**. *J. Virol. Methods*. 146, 409-413
- Fuenmayor, J., Gòdia F. & Cervera L. (2017) **Production of virus-like particles for vaccines**. *N Biotechnol*. 39, 174-180
- Gilbert, L., Toivola J., White, D., Ihalainen, T., Smith, W., Lindholm, L., Vuento, M. & Oker-Blom, C. (2005) **Molecular and structural characterization of fluorescent human parvovirus B19 virus-like particles**. 331, 527-535
- Gallinella, G. (2013) **Parvovirus B19 achievements and challenges**. *ISRN Virol*. 2013, 1-33
- Gupta, R., Gupta, N. & Rathi, P. (2004) **Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties**. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 763-781
- Heegaard, E.D. & Brown, K.E (2002) **Human Parvovirus B19**. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 485-505
- ICTV (2014). **Virus Taxonomy: 2014 Release**. <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. (Acceso 17 de Abril de 2017)
- Kajigaya, S., Fujii, H., Field, A., Anderson, S., Rosenfeld, S., Anderson, L.J., Shimada, T. & Young, N.S. (1991) **Self-assembled B19 parvovirus capsids, produced in a baculovirus system, are antigenically and immunogenically similar to native virions**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88, 4646-4650
- Kaufmann, B., Simpson, A.A. & Rossmann, M.G. (2004) **The structure of human parvovirus B19**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101, 11628-11633
- Klon, A.E., Héroux, A., Ross, L.J., Pathak, V., Johnson, C.A., Piper, J.R. & Borhani, D.W. (2002) **Atomic structures of human dihydrofolate reductase complexed with NADPH and two lipophilic antifolates at 1.09 Å and 1.05 Å resolution**. *J. Mol. Biol.* 320, 677-693
- Kovalevskaya, N.V., Smurnyy, Y.D., Polshakov, V., Birdsall, B., Bradbury, A.F., Frenkiel, T. & Feeney J. (2005) **Solution structure of human dihydrofolate reductase in its complex with trimethoprim and NADPH**. *J. Biomol. NMR*. 33, 69-72
- McCall, L.I., Siqueira-Neto, J.L. & McKerrow, J.H. (2016) **Location, Location, Location: Five Facts about Tissue Tropism and Pathogenesis**. *PLoS Pathog.* 12, 1-4

- McEntee, G., Minguzzi, S., O'Brien, K., Ben Larbi, N., Loscher, C., O'Fágáin, C. & Parle-McDermott, A. (2011) **The former annotated human pseudogene dihydrofolate reductase-like 1 (DHFR1) is expressed and functional.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108, 15157-15162
- Mora-Luga, R. (2008) **Propiedades catalíticas y termoestabilidad de la lipasa recombinante de *Bacillus pumilus* GMA1.** *Tesis de maestría, UNAM.*
- Morán-García, A. C., Rivera-Toledo, E., Echeverría, O., Vázquez-Nin, G., Gómez, B. & Bustos-Jaimes, I. (2016) **Peptide presentation on primate erythroparvovirus 1 virus-like particles: In vitro assembly, stability and immunological properties.** *Virus Res.* 224, 12-18
- Murthy, A.M., Ni, Y., Meng, Y. & Zhang, C. (2015) **Production and evaluation of virus-like particles displaying immunogenic epitopes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV).** *Int. J. Mol. Sci.* 16, 8382-8396
- Ogasawara, Y., Amexis, G., Yamaguchi, H., Kajigaya, S., Leppla, S.H. & Young N.S. (2006) **Recombinant viral-like particles of parvovirus B19 as antigen carriers of anthrax protective antigen.** *In vivo.* 20, 319-324
- Pédélecq, J.D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T.C. & Waldo G.S. **Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein.** *Nat. Biotechnol.* 24, 79-88
- Rahbar N., Vali Zadeh S., Ghorbani R. & Kheradmand P. (2015) **Prevalence of parvovirus B19 specific antibody in pregnant women with spontaneous abortion.** *Acta Med. Iran.* 53, 168-172
- Rao, A.S. & Tapale, R.S. (2013) **A study on dihydrofolate reductase and its inhibitors: A review.** *IJPSR.* 4, 2535-2547
- Reid, B.G. & Flynn, G.C. (1997) **Chromophore Formation in Green Fluorescent Protein.** *Biochemistry.* 36, 6786-6791
- Remington, S.J. (2011) **Green fluorescent protein: A perspective.** *Protein Sci.* 20, 1509-1519
- Rodzinski, A., Guduru, R., Liang, P., Hadjikhani, A., Stewart, T., Stimphil E., Runowicz C., Cote, R., Altman, N., Datar, R. & Khizroev, S (2016) **Targeted and controlled anticancer drug delivery and release with magnetoelectric nanoparticles.** *Sci Rep.* 6, 1-14
- Rueda, P., Hurtado, A., del Barrio, M., Martínez-Torrecedrada, J.L., Kamstrup, S., Leclerc, C. & Casal, J.I. (1999) **Minor Displacements in the Insertion Site Provoke Major Differences in the Induction of Antibody Responses by Chimeric Parvovirus-like Particles.** *Virology.* 253, 89-99
- Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001) **Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Protocol 26: Transformation of *E.coli* by Electroporation.** *CSHL Press .3 edición, 1, 1.32-1.34*
- Sanchez-Rodriguez, P., Munch-Anguiano, L. & Bustos-Jaimes, I. (2010) **Advances in the development of virus-like particles as tools in medicine and nanoscience.** *Curr. Chem. Biol.* 4, 231-243
- Sánchez-Rodríguez S.P., Münch-Anguiano L., Echeverría O., Vázquez-Nin G., Mora-Pale M., Dordick J.S. & Bustos-Jaimes I. (2012) **Human parvovirus B19 virus-like particles: In vitro assembly and stability.** *Biochimie.* 94, 870-878

- Sánchez-Rodríguez, S.P., Enríquez-Avila, J.V. Soto-Fajardo, J., Peña-Montes, C. & Bustos-Jaimes, I. (2015) **In vitro encapsulation of heterologous dsDNA into human parvovirus B19 virus-like particles.** *Mol. Biotechnol.* 57, 309-317
- Santillán-Uribe, J.S., Valadez-García, J., Morán-García, A., Santillán-Uribe, H.C & Bustos-Jaimes, I. (2015) **Peptide display on a surface loop of human parvovirus B19 VP2: Assembly and characterization of virus-like particles.** *Virus Res.* 201, 1-7
- Santillán-Uribe, H.C. (2017) **Construcción y caracterización de estructuras supramoleculares basadas en el parvovirus B19.** *Tesis de maestría, UNAM*
- Schnell, J.R., Dyson, H.J. & Wright, P.E. (2004) **Structure, dynamics, and catalytic function of dihydrofolate reductase.** *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33, 119-140
- Servant-Delmas A. & Morinet, F. (2016) **Update of the human parvovirus B19 biology.** *Transfus. Clin. Biol.* 23, 5-12
- Shirbaghaee, Z. & Bolhassani, A. (2016) **Different applications of virus-like particles in biology and medicine: Vaccination and delivery systems.** *Biopolymers.* 105, 113-132
- Soto-Valerio, I. (2017) **Producción caracterización y replegamiento de una  $\alpha$ -glucosidasa quimérica de *Saccharomyces cerevisiae* expresada en *Escherichia coli*.** *Tesis de licenciatura, UNAM*
- Summers, J., Jones, S.E. & Anderson, M.J. (1983) **Characterization of the genome of the agent of erythrocyte aplasia permits its classification as a human parvovirus.** *J. Gen. Virol.* 64, 2527-2532
- Tao, H., Liu, W., Simmons, B.N., Harris, H.K., Cox, T.C. & Massiah, M.A. (2010) **Purifying natively folded proteins from inclusion bodies using sarkosyl, Triton X-100, and CHAPS.** *Biotechniques.* 48, 61-64
- Tsien, R.Y. (1998) **The green fluorescent protein.** *Annu. Rev. Biochem.* 67, 509-544
- Van Pouderooyen, G., Eggert, T., Jaeger, K.E. & Dijkstra, B.W. (2001) **The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal alpha/beta hydrolase fold enzyme.** *J. Mol. Biol.* 309, 215-226
- Waty R., Mustopa, A.Z., Suharsono, S., Ningrum, R. A. & Murtiyaningsih, H. (2017) **Soluble expression and purification of hepatitis B core antigen (HBcAg) subgenotype B3 in *Escherichia coli* using thioredoxin fusion tag.** *Asian Pac. Dis.* 7, 496-501
- Yamamoto, K., Miyake, H., Kusunoki, M. & Osaki S. (2010) **Crystal structures of isomaltase from *Saccharomyces cerevisiae* and in complex with its competitive inhibitor maltose.** *FEBS J.* 277, 4205-4214
- Yamamoto, K., Miyake, H., Kusunoki, M. & Osaki S. (2011) **Steric hindrance by 2 amino acid residues determines the substrate specificity of isomaltase from *Saccharomyces cerevisiae*.** *J. Biosci. Bioeng.* 112, 545-550
- Yan, D., Wei, Y.Q., Guo, H. & Sun, S.Q. (2015) **The application of virus-like particles as vaccines and biological vehicles.** *App. Microbiol. Biotechnol.* 99, 10415-10432

Yang, F., Moss, L.G. & Phillips, G. N. (1996) **The molecular structure of green fluorescent protein.** *Nat. Biotechnol.* 14, 1246-1251

Young, N.S. & Brown, K.E (2004) **Parvovirus B19.** *N. Engl. J. Med.* 350, 586-597

Zimmer, M. (2002) **Green Fluorescent Protein (GFP): Applications, Structure, and Related Photophysical Behavior.** *Chem. Rev.* 102, 759-781