



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

### INGENIERÍA DE PARTÍCULAS TIPO VIRUS PARA EL ENCAPSULAMIENTO IN VITRO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

#### TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Carlos Francisco Coffeen Cruz

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Ismael Bustos Jaimes  
[Facultad de Medicina, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Armando Hernández García  
[Instituto de Química, UNAM](#)

Dr. Miguel Antonio Costas Basín  
[Facultad de Química, UNAM](#)

Ciudad de México. Marzo, 2021



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	Garza-Ramos Martínez Georgina Regina
VOCAL	González Andrade Martín
VOCAL	Palomares Aguilera Laura Alicia
VOCAL	García Hernández Enrique
SECRETARIO	Domínguez Dueñas Laura

ESTE TRABAJO CONTO CON LOS RECURSOS DEL PROGRAMA DE APOYO A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN TECNOLÓGICA (PAPIIT), UNAM, IN205119

DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE PROYECTO FUI BENEFICIADO CON UNA BECA OTORGADA POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) PARA APOYO A ESTUDIOS DE MAESTRÍA

**Dedicado a mi familia**  
**Muchas gracias por todo su cariño y apoyo**

## **Agradecimientos**

A mi tutor principal, el Dr. Ismael Bustos Jaimes, que me brindo valiosos consejos a lo largo del proyecto, le agradezco mucho su apoyo y amistad.

A mi comité tutor, Dr. Armando Hernández García y Dr. Miguel Antonio Costas Basín, por su excelente retroalimentación que ayudo a darle forma a este proyecto semestre a semestre

A las técnicas académicas del Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas (LFQIP), Dra. Isabel Velásquez López, M. en C. Laura Iliana Alvares Añorve y Q.F.B. Eugenia Flores Robledo, por todo el apoyo técnico otorgado durante mi estancia.

A mi jurado de examen, Dra. Georgina Garza-Ramos Martínez, Dr. Martín González Andrade, Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera, Dr. Enrique García Hernández, Dra. Domínguez Dueñas Laura, por todas sus observaciones que complementaron y mejoraron este escrito.

A mis compañeros del grupo de trabajo, Hugo, Iris, Ignacio, Javier, Jorge, Lolita, Lourdes, Maribel y Willy, gracias por su apoyo y amistad a lo largo de toda la maestría.

A todos mis compañeros del LFQIP, Alex, Cinthya, Daniel, Eloy, Esaú, Erendira, Fátima, Hugo L., Ricardo, Renan, Sergio S. y Sergio R., que siempre hicieron que hubiera un gran ambiente en el laboratorio y me permitieron aprender mucho de ustedes

## Índice

<b>RESUMEN</b> .....	<b>8</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
La nanobiotecnología y las partículas virales .....	9
Las partículas tipo virus y sus principales aplicaciones .....	13
La bioingeniería y funcionalización de las VLP .....	17
Los parvovirus: clasificación y características de interés nanobiotecnológico .....	20
Mecanismos de ensamblaje y características de los virus de cadena sencilla.....	23
Los péptidos de unión a ácidos nucleicos y las protaminas .....	30
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>33</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>35</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>36</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
Esquema general de trabajo .....	37
Materiales.....	38
Diseño y construcción de la proteína quimérica VP2-R6FGR6 .....	39
Sobreexpresión de la proteína recombinante VP2R12(C) .....	43
Obtención de la proteína VP2R12(C) en cuerpos de inclusión.....	44
Purificación de la proteína recombinante VP2R12(C).....	45
Pruebas de ensamble y caracterización de VLP con base en la proteína VP2R12(C) mediante DLS .....	46
Ensayos del cambio en la movilidad electroforética (EMSA) .....	46
Cuantificación por espectrofluorometría del DNA encapsulado en las VLP de VP2R12(C) a partir de EMSA.....	47
Purificación de VLP con DNA mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC) .....	48
Análisis de las VLP y su DNA mediante espectrofluorometría.....	48
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>49</b>
Diseño y construcción de la proteína quimérica VP2R12(N) .....	49
Pruebas de sobreexpresión de la proteína VP2R12(N) .....	50
Pruebas de sobreexpresión y purificación de la proteína VP2R12(C) .....	50
Pruebas de ensamble y caracterización de VLP con base en la proteína VP2R12(C) mediante DLS .....	52
Ensayos del cambio en la movilidad electroforética (EMSA) .....	56
Análisis por microscopía de fuerza atómica (AFM) de VLP VP2R12(C).....	61

Cuantificación por espectrofluorimetría del DNA encapsulado en las VLP de VP2R12(C) obtenidas por EMSA.....	62
Pruebas de protección contra DNasas y caracterización mediante cromatografía de exclusión molecular y espectrofluorimetría .....	65
Cuantificación por espectrofluorimetría del DNA encapsulado en las VLP de VP2R12(C) obtenidas por SEC.....	68
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>70</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>72</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>76</b>



## 1. RESUMEN

Los virus son sistemas biológicos parasitarios que no pueden reproducirse por sí mismos. Sin embargo, una vez que estos infectan una célula susceptible, pueden ocupar la maquinaria celular para multiplicarse. Actualmente, gracias al desarrollo de la nanobiotecnología, tenemos un gran número de nanomateriales basados en estos sistemas biológicos. En este caso, las partículas tipo virus (VLP) han atraído interés debido al éxito que tienen los virus como vectores de entrega de material genético y por su capacidad de formar poblaciones de partículas muy homogéneas. El desafío para las aplicaciones que buscan encapsular material genético heterólogo está en modificar las cargas de la proteína viral, para favorecer su interacción con el material genético, sin que se vea comprometida la estabilidad de la cápside. Para esto, se propuso el acoplamiento de un péptido rico en arginina en uno de los extremos de la proteína viral para favorecer su interacción con material genético de forma inespecífica. En este trabajo, se obtuvo una proteína que mostró mayor afinidad por el DNA de doble cadena, en comparación con la proteína silvestre. Las VLP obtenidas con base en esta proteína se analizaron mediante técnicas como la dispersión dinámica de luz, electroforesis, fluorescencia y microscopia, con las que se demostró que eran capaces de encapsular y proteger al material genético. Estas nuevas partículas sirven como base para el desarrollo futuro de sistemas de entrega de ácidos nucleicos.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 La nanobiotecnología y las partículas virales

Como suele suceder en muchas áreas de la ciencia, las limitaciones tecnológicas empiezan a volverse más evidentes conforme avanza el tiempo y la comprensión sobre el tema. En el caso particular de la bioquímica de macromoléculas, la nanotecnología se ha posicionado como una herramienta fundamental para su desarrollo, la cual se ha convertido en una de las estrategias de diseño e ingeniería más innovadoras y poderosas en las últimas décadas. Debido a lo anterior, la nanotecnología también ha contribuido de manera importante en el avance de otras áreas relacionadas, como son la química, la biología sintética, el medio ambiente y la medicina (Dahman, 2017). De forma simple y concreta, podemos definir a la nanotecnología como la ciencia que nos permite trabajar con nanomateriales mediante la manipulación de la materia, en escalas atómicas, moleculares y supramoleculares. La Iniciativa Nacional de Nanotecnología de los E.E.U.U. (INN) ofrece una descripción más precisa, que la define como la manipulación de la materia con una dimensión de tamaño de 1 a 100 nm ([www.nano.gov](http://www.nano.gov)).

Por otro lado, también está la biotecnología, la cual utiliza el conocimiento y las estrategias de la biología para manipular los procesos celulares, genéticos y moleculares con el fin de desarrollar productos y optimizar los servicios en diversos campos; desde la industria hasta la medicina. La biotecnología puede ir desde los procesos básicos, como son el uso de microorganismos para la producción de alimentos (pan, queso, cerveza), hasta los procesos actuales más complejos, donde generalmente se requiere de modificaciones moleculares de los sistemas biológicos para obtener los productos de interés ([www.bio.org](http://www.bio.org)). La biotecnología moderna nos permite obtener productos y tecnologías de vanguardia para combatir las enfermedades, reducir nuestra huella ambiental, cubrir las necesidades de alimento, usar menos energía y producirla de forma más limpia, y tener procesos de fabricación industrial más seguros, limpios y eficientes (Gusić et al., 2014)

Posteriormente se dio la fusión o complementación entre la nanotecnología y la biotecnología, lo que llevó al surgimiento de la nanobiotecnología; la cual ofrece posibilidades sin precedentes en el estudio y la modulación de procesos biológicos a escala molecular. La nanobiotecnología nos ha permitido aplicar las herramientas nanotecnológicas en el estudio y aprovechamiento de las ciencias de la vida. Debido a lo anterior, su desarrollo nos ha servido para complementar el avance y entendimiento de otras áreas científicas, así como también para poder generar nuevas aplicaciones. Estas pueden ser para el diagnóstico de enfermedades complejas, la obtención de modelos estructurales de proteínas, el diseño y funcionalización de estructuras supramoleculares, la administración de fármacos

tejido específicos, entre algunos otros. Además, esta tecnología tiene un potencial real para revolucionar muchas de las herramientas y procedimientos médicos existentes para que sean personalizados, eficientes, pequeños y quizás, más baratos (Saini et al., 2006; Nash & Shoseyov, 2016).

Gracias al desarrollo de la nanobiotecnología, podemos obtener un gran número de nanomateriales basados en sistemas biológicos, siendo los microorganismos los más utilizados. Uno de los nanomateriales generados a partir de estos sistemas microbiológicos son las proteínas virales, las cuales son utilizadas para la producción de partículas tipo virus (de las cuales se hablará más adelante). El uso de estas estructuras virales en particular, ha llevado a avances en el conocimiento científico sobre el autoensamble y el desarrollo de nuevos materiales con aplicaciones de gran alcance. A pesar de que los virus se han estudiado durante más de 100 años y se han descubierto y descrito miles de ellos, aún en la actualidad no se tienen números aproximados de todas las posibles especies que puedan existir, lo que nos deja ante un campo de aprovechamiento con muchas posibilidades (Mahmoudabadi & Phillips, 2018).

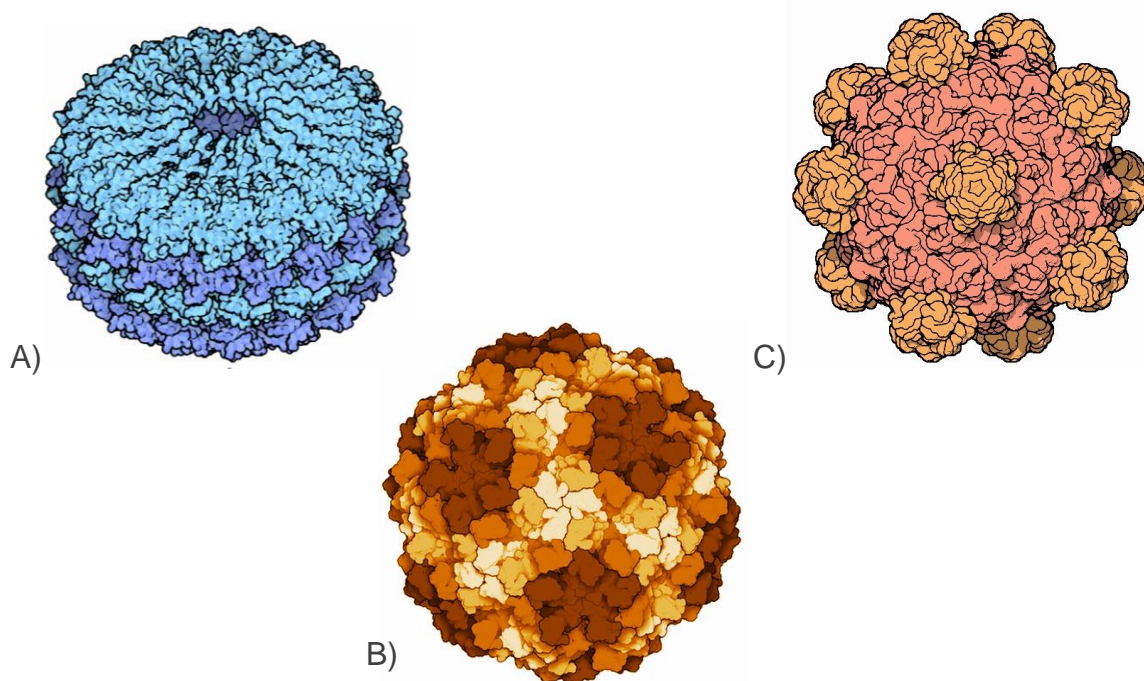
Debido a esta enorme diversidad, existen virus con una gran variedad de formas y tamaños que, desde el punto de vista de la química supramolecular, presentan características estructurales dinámicas y relevantes para desarrollos tecnológicos. Hasta la fecha, no ha sido posible crear sintéticamente nanopartículas con una reproducibilidad, robustez y utilidad comparables. Por lo tanto, la investigación sobre “virología estructural” está dirigida a desentrañar los procesos de autoensamble y empaquetamiento de su material genético, para así poder aprender a controlar el autoensamble de otros materiales basados en virus en estructuras jerárquicas de un orden superior. Esto permitirá la creación y estudio de materiales basados en sistemas virales para aplicaciones en sectores de biomedicina e industria, así como su fabricación en una escala de producción mayor (Perlmutter & Hagan, 2015; Wen & Steinmetz, 2016).

Para poder trabajar con virus, primero debemos entender sus estructuras moleculares y las características de cada una de estas. Los virus son contenedores supramoleculares, formados a partir de una cubierta proteica o cápside que contiene en su interior el genoma viral. A partir del punto anterior, los virus se comienzan a diferenciar entre sí por variaciones en la estructura de sus cápsides y por el material genético que contienen, el cual puede ser DNA o RNA. En algunos casos también se ha visto que el tamaño y la estructura de la cápside está en función de la longitud del genoma que alberga (Lucas & Knipe, 2002). Además de las características anteriores, también podemos encontrar virus envueltos, los cuales tienen una membrana lipídica que recubre su cápside; esta se conoce como envoltura viral y es obtenida de las células que estos invaden. Esta envoltura viral les da propiedades únicas para infectar, ya que pueden fusionar su membrana con la del hospedero y

de esta forma entrar a las células de una forma más eficiente que otros virus. (Lucas & Knipe, 2002; White & Whittaker, 2016)

La extensa variedad de cápsides virales que podemos encontrar depende principalmente de la simetría que presentan sus capsómeros, los cuales son las unidades estructurales de las cápsides. Los capsómeros, a su vez, suelen estar conformados por varias subunidades proteicas que pueden ser idénticas o diferentes entre sí. Dependiendo del número y estructura de las subunidades que conforman a un capsómero, se pueden obtener diferentes simetrías que dan lugar a los distintos tipos de cápsides (Prasad & Schmid, 2012).

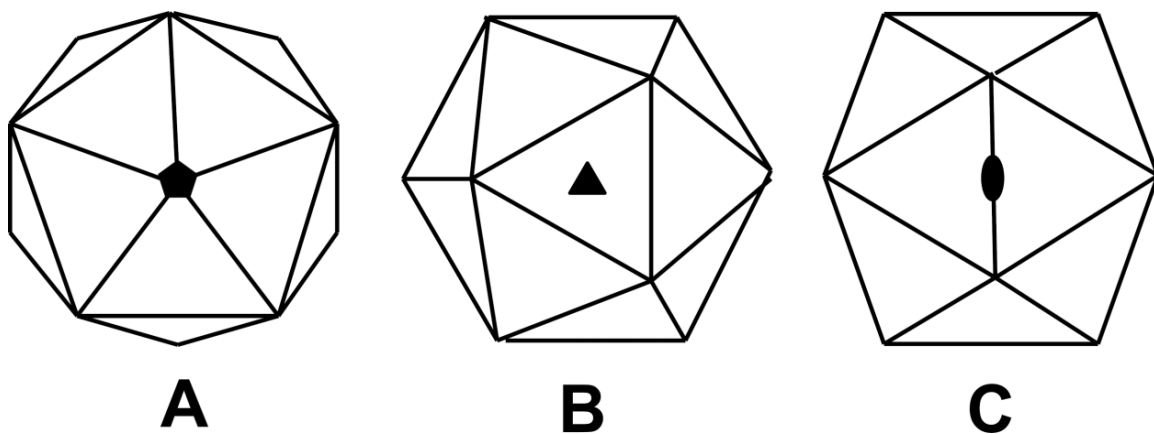
Las cápsides virales están clasificadas en tres grandes grupos: helicoidales, icosaédricas (esféricas) y complejas (irregulares). Esto depende del arreglo estructural que puedan tener los capsómeros, así como de la forma en que encapsulan y protegen su material genético. El primer tipo de cápside que podemos encontrar son las que presentan simetría helicoidal (Figura 1A), en esta los capsómeros se unen a una región específica del genoma para formar una unidad de nucleación y a partir de esta se termina de polimerizar su estructura. Como ejemplo, tenemos a las familias Rhabdovirus (Ge et al., 2010) y Tobamovirus; estos últimos se conocen como virus del mosaico del tabaco y en ellos se ha observado un genoma ordenado a lo largo de la cápside, dependiente de la forma helicoidal. (Stubbs & Kendall, 2012). Normalmente el tamaño de esta clase de virus suele estar relacionado directamente con la longitud total de su genoma.



**Figura 1.** Tipos de cápsides virales. Cápside helicoidal (A), cápside icosaédrica (B) y cápside compleja (C). Imágenes modificadas a partir del trabajo de Goodsell et al., (2015) The RCSB PDB "Molecule of the Month": Inspiring a Molecular View of Biology.

Después tenemos a las cápsides que presentan una simetría icosaédrica (Figura 1B), las cuales suelen ser más complejas que las helicoidales y tienen más variantes. Las cápsides que presentan esta estructura, tienen una simetría del tipo 5-3-2, la cual hace referencia a los ejes de simetría que se requieren para formarlas (Figura 2). Una estructura de este tipo consta de 12 ejes de simetría rotacional pentavalente, 20 caras con una simetría trilateral y 30 bordes con simetría bilateral. Estas cápsides a su vez se clasifican por su número de triangulación (T), el cual fue desarrollado por Caspar y Klug en 1962.

El número de triangulación nos permite conocer el número de copias que se requieren de una subunidad proteica ( $60T$ ) para completar una cápside. Para esto tenemos que asumir que el tamaño de la subunidad siempre es el mismo y que solo varía el número de estas. Partiendo de lo anterior, la cara triangular básica del icosaedro puede ampliarse primero y luego subdividirse en triángulos más pequeños. De esta manera, el número T toma valores discretos que permitan subdividir a un triángulo equilátero como 1, 3, 4, 7, etc. (Caspar & Klug, 1962; Prasad & Schmid, 2012).



**Figura 2.** Ejes de simetría de un virus icosaédrico. Los ejes de simetría pentavalente (A), trilateral (B) y bilateral (C) se muestran en cada cápside, respectivamente (Prasad & Schmid, 2012).

Entendiendo lo anterior, podemos saber por ejemplo que en un virus  $T=3$ , a diferencia de los 20 triángulos (capsómeros) de los que se compone un virus  $T=1$ , los suyos se componen por 3 cada uno. Esto nos da un total de 60 capsómeros, los cuales a su vez siguen teniendo 3 subunidades cada uno ( $60(T=3)$ ). Por lo tanto, en este caso tendríamos un virus con 180 subunidades proteicas. Sin embargo, no todos los virus se comportan de esta manera, también tenemos que recordar que un gran número de cápsides virales se componen de 2 o más proteínas diferentes. Por lo que la determinación de su geometría y del número de subunidades se vuelve mucho más complejo (Prasad & Schmid, 2012; Wilson, 2016).

Este último es el caso de las cápsides complejas o con simetrías irregulares, las cuales, como ya mencioné, son estructuras de una mayor complejidad, ya que presentan más de 60 subunidades proteicas y se componen de dos o más tipos de proteínas (Figura 1C). Para poder alcanzar su estructura final dependen de otros factores, como proteínas de andamiaje, proteínas accesorias, maduración dependiente de proteólisis e incluso cambios conformacionales a mayor escala en sus principales subunidades proteicas. Esto último genera estructuras asimétricas o cuasi equivalentes, debido a que el entorno de interacción entre las diferentes subunidades no puede ser estrictamente equivalente, dando como resultado la formación de ejes hexavalentes, además de las posiciones pentavalentes en la estructura icosaédrica (Prasad & Schmid, 2012).

Con todo lo anterior, podemos hacernos una idea de la gran variedad de partículas virales que se pueden encontrar y utilizar para la experimentación. No obstante, en el ámbito de la nanobiotecnología se suele trabajar con virus sin envoltura lipídica o “desnudos”, los cuales son más fáciles de manejar ya que su producción a través de sistemas heterólogos suele ser más sencilla. De otra forma, si la estructura presenta una membrana lipídica, el ensamble y desensamble de la cápside viral suele presentar limitantes y complicaciones para su manejo.

## **2.2 Las partículas tipo virus y sus principales aplicaciones**

Actualmente uno de los campos de investigación de mayor interés sobre los virus tiene que ver con el desarrollo de partículas tipo virus, o VLP por sus siglas en inglés. Las VLP han atraído interés debido al éxito que tienen los virus como vectores de entrega de material genético a otros organismos, y por su capacidad de formar estructuras supramoleculares homogéneas. Las VLP son estructuras proteicas supramoleculares auto ensamblables, con una estructura idéntica o altamente relacionada con sus virus nativos correspondientes. El término VLP también se ha utilizado para describir una serie de objetos biológicos como: estructuras no caracterizadas con morfología viral que se encuentran en muestras biológicas, estructuras vacías de origen viral que no contienen ácidos nucleicos, e incluso virus no infecciosos con modificaciones químicas o genéticas en su estructura, resultantes de la clonación y expresión de genes estructurales modificados en sistemas hospederos heterólogos (Zeltins, 2012). Esto los vuelve en la mayoría de los casos, un modelo seguro y práctico para la investigación, ya que no se requieren las mismas medidas de bioseguridad que requiere un laboratorio que trabaja virus con potencial patogénico.

Gracias a todas estas ventajas, las investigaciones con VLP han hecho grandes avances en el campo de la vacunología en las últimas tres décadas. Estas partículas constituyen herramientas versátiles para el desarrollo de vacunas, debido a sus características inmunológicas favorables, como su tamaño, superficie

repetitiva (multivalencia), capacidad de inducir respuestas inmunes innatas y adaptativas, y el hecho de que sean estructuras seguras (Mohsen et al., 2017).

Las vacunas basadas en VLP han mostrado más ventajas que aquellas basadas en virus atenuados o inactivos. Esto es gracias al plegamiento correcto de las subunidades proteicas, ensambladas en una estructura con superficie multivalente que produce respuestas altamente inmunogénicas. La estructura superficial, al ser rígida y repetitiva genera un buen patrón estructural del antígeno asociado, lo que facilita la interconexión con los receptores de células B. En varios estudios se ha demostrado que las vacunas basadas en VLP generan una alta respuesta humoral e inmune mediada por la activación de células B, causando una mayor producción de anticuerpos sin la necesidad de adicionar adyuvantes inmunológicos a la vacuna. A la fecha, ya existen algunas de estas vacunas en el mercado, como Cervarix<sup>®</sup> para el virus del papiloma humano o Sci-B-Vac<sup>™</sup> para el virus de la Hepatitis B (Mohsen et al., 2017; Storni et al., 2002;). En contraste, las vacunas “tradicionales” suelen tener proteínas virales desensambladas y con un plegamiento incorrecto en algunos casos, lo que lleva a una presentación deficiente al sistema inmune. Por esa razón suelen requerir de adyuvantes químicos (Liu et al., 2012).

Otra aplicación importante que tienen las VLP es el de almacenamiento y transporte de moléculas. Derivado de su función biológica, las VLP son capaces de encapsular, proteger y entregar material genético exógeno a tejidos específicos. Estas propiedades, junto con su biocompatibilidad innata, hacen a la VLP un excelente sistema de entrega (genes o incluso de fármacos) para tratamientos de terapia dirigida. En el caso de la terapia génica, los virus que se evalúan como vehículos de entrega deben tener la capacidad de llevar su genoma hasta el núcleo celular. Otro factor es que, dependiendo de la especie, los virus tienen tropismos específicos para diferentes tejidos, los cuales no siempre son de interés para el tratamiento. Es así que, para poder ocupar uno de estos virus como vector de entrega, se tiene que realizar modificaciones en su estructura e incluso se llegan a ocupar sistemas de acoplamiento proteico anexos que permitan modificar su tropismo hacia el tipo de célula de interés (Chen et al., 2010; Deng et al., 2015; Hoffmann et al., 2016).

Por esta razón, las VLP no deben verse como sistemas perfectos, ya que además suelen tener otros inconvenientes, como la inmunogenicidad, la citotoxicidad y la generación de reacciones inflamatorias. En los últimos años, la optimización de las VLP se ha vuelto fundamental para su aplicación en terapias dirigidas. Para rediseñar las estructuras virales, se utiliza la ingeniería genética y/o métodos químicos para modificar aminoácidos que permitan darle nuevas funciones. Sin embargo, aún no se han logrado desarrollar VLP con una alta eficiencia en la entrega de genes, debido a la complejidad de las mutaciones requeridas y la estabilidad de las proteínas virales. Las modificaciones pueden afectar el ensamblaje de la cápside, su interacción con el material genético e incluso puede

terminar afectando el tropismo hacia un tejido específico, lo que lleva a problemas de inespecificidad que representan un riesgo grande para su aplicación (Jeevanandam et al., 2019).

No obstante, la aplicación de las VLP no termina ahí, también se las ha utilizado para administrar enzimas, antígenos y para construir nuevos nanomateriales de última generación. La fuerza y la selectividad de las interacciones proteína-proteína, los vuelven excelentes sistemas enlazantes entre nanopartículas y proteínas para generar estructuras más ordenadas y con la capacidad de tener distintas funciones. Estos materiales biohíbridos pueden funcionar como biosensores, nanocircuitos, sistemas recolectores de luz e incluso nanobaterías (Jeevanandam et al., 2019). Como ejemplo tenemos el caso de las VLP derivadas del bacteriófago P22, las cuales fueron utilizadas para la encapsulación de enzimas activas, como un nanovehículo para la activación enzimática de tamoxifeno en células tumorales (Patterson, 2018).

Independientemente de su aplicación, para producir una VLP funcional que imite eficazmente a un virus real, se necesitan buenos rendimientos de la proteína estructural del virus. Luego, estas proteínas deben ensamblarse correctamente en una partícula que reproduzca la conformación original de la cápside del virus infeccioso. En el caso de las vacunas, se requiere que la VLP este correctamente ensamblada y con las modificaciones postraduccionales necesarias. Por eso, en muchos casos, para su producción se utilizan sistemas de expresión que permitan obtener la partícula soluble, y posteriormente se la purifica de una gran cantidad de contaminantes *ex vivo*. Por otra parte, si lo que se busca es desarrollar un sistema de entrega de genes o fármacos, se necesita agregar pasos de desmontaje y reensamblaje a los procesos de producción de la VLP. La complejidad de esto radica, en lograr reensamblar nuevamente a las VLP de manera homogénea en un proceso *in vitro*, y que estas sigan siendo funcionales (Fuenmayor et al., 2017).

Con esto nos podemos dar una idea, de que la producción de VLP no es una tarea sencilla y suele tener bastantes desafíos a lo largo del proceso. Las VLP se pueden producir en más de 170 sistemas de expresión diferentes derivados de células de bacterias, insectos, levaduras, mamíferos, y plantas. No obstante, la elección del sistema de expresión y la estrategia para la producción, va a depender de varios factores. En este caso, el más importante es la aplicación que se busca darle a la VLP, además del costo de producción y si esta requieren modificaciones postraduccionales. El sistema de expresión elegido para la producción de la proteína viral, debe tener en cuenta los requisitos para el funcionamiento correcto de la partícula final (Fuenmayor et al., 2017; Mohsen et al., 2017).

Actualmente casi el 30% de las VLP se producen en sistemas bacterianos (principalmente *E. coli*), donde los genes de proteínas virales son optimizados para bacterias y clonados en plásmidos para su expresión. Este proceso asegura una



alta producción de las proteínas recombinantes deseadas, no obstante, los sistemas bacterianos presentan algunos inconvenientes, pues son incapaces de introducir modificaciones postraduccionales, como la glicosilación (comúnmente presente en las proteínas eucariotas). Además, tienden a producir estas proteínas de forma insoluble en cuerpos de inclusión (Arevalo et al., 2016; Mohsen et al., 2017). Los sistemas de expresión en levadura también se han utilizado ampliamente para la producción de VLP, como en la producción de las vacunas comerciales contra el VPH y el virus de la hepatitis B. Debido a su capacidad para realizar ciertas modificaciones postraduccionales, y que pueden producir un mayor número de VLP en forma soluble, las levaduras representan el siguiente nivel en la producción de VLP. Sin embargo, las levaduras tienen sus limitaciones y por lo tanto, se las emplea comúnmente en la producción de VLP simples y sin envoltura lipídica, ya que en este caso son plataformas rápidas y eficientes para la producción (Fuenmayor et al., 2017; Pattenden et al., 2005).

Los sistemas de células de insectos y mamíferos también son bastante utilizados para producir VLP. En el caso de estos sistemas de expresión, las partículas virales se producen plegadas, solubles y con las modificaciones postraduccionales correctas, pero tienen la desventaja de ser más costosos, complicados y de tener rendimientos menores comparados con otros sistemas (Strobl et al., 2020). En general, cualquier proceso de producción de VLP basado en células tiene una alta probabilidad de incorporar elementos celulares no deseados en su interior, los cuales podrían causar inmunogenicidad e incrementar la variabilidad de cada lote de producción. Por eso, es importante la eliminación previa de posibles contaminantes para poder utilizar las partículas con fines biomédicos y biotecnológicos (Díaz et al., 2018; Saini et al., 2006; Masavuli et al., 2017). Para esto, se debe dar un tratamiento post-expresión, en donde se desensamblan las VLP, para luego purificar a las proteínas estructurales del virus y finalmente reensamblar las partículas. Desafortunadamente, los sistemas de células de insectos y mamíferos se suelen ocupar para producir virus con arreglos estructurales más complejos, los cuales difícilmente pueden ser reensamblados *in vitro*. En ciertos casos, eso puede llegar a representar un problema para el uso de algunas VLP. (Pattenden et al., 2005).

Como ya se mencionó, estos pasos adicionales de desensamble y reensamble también son necesarios si se busca encapsular una molécula de interés dentro de la cápside. Esto limita la producción de VLP, ya que no todas se pueden ensamblarse *in vitro*. Además, en algunos casos, se ha observado que el proceso de reensamble *in vitro* de las cápsides puede favorecer un ensamblaje incorrecto e incluso, la agregación de los capsómeros. Esto es debido en gran medida a que no se cuenta con la ayuda de chaperonas o proteínas de andamiaje que favorezcan su correcto plegamiento, las cuales únicamente se encuentran en los sistemas *in vivo* (Parent & Teschke, 2007).

### 2.3 La bioingeniería y funcionalización de las VLP

Para poder ocupar a las VLP como sistemas de almacenamiento y entrega de moléculas de interés, es necesario favorecer la interacción y retención de estas últimas en la cavidad interna de las partículas. En la naturaleza, la superficie de la cavidad interna de las cápsides a menudo muestra una afinidad intrínseca hacia su molécula de carga natural, lo que permite la encapsulación de moléculas con propiedades similares.

En algunos tipos de virus, gracias a procesos evolutivos, las subunidades proteicas de la cápside presentan una alta concentración de aminoácidos con carga positiva, lo que les permite unir y encapsular moléculas con carga negativa de forma inespecífica. En varios casos se ha observado que, al encapsular ácidos nucleicos, se mejora el autoensamble de las subunidades y su estabilidad. Este mecanismo ha sido explotado para encapsular moléculas no nativas en VLP (Díaz et al. 2018; Fang et al., 2016; Lu et al., 2012). Sin embargo, no todas las cápsides virales tienen esta característica, existen algunas que muestran mecanismos de interacción más complejos para la encapsulación de su material genético nativo. Estas otras cápsides presentan interacciones específicas en ciertas regiones de la superficie interior con iones divalentes y alguna secuencia específica de su material genético nativo (Speir & Johnson, 2013). En la mayoría de las cápsides virales es importante la optimización de las características del sistema de encapsulamiento. Así mismo, se debe buscar que tanto la estabilidad de las VLP como la de su molécula de carga, sean compatibles con las condiciones de almacenamiento y aplicación.

El rediseño de proteínas nativas que dan origen a estructuras supramoleculares suele ser un desafío, ya que muchas de estas han evolucionado hasta el punto de tener una sutil y compleja estabilidad, lo que significa que incluso la menor modificación en su estructura puede llevar al despliegue, desensamble e incluso a su agregación (Huang et al., 2016). Por lo tanto, es importante entender cómo las proteínas se pliegan y mantienen su estructura, para poder predecir de una mejor manera las regiones susceptibles a modificaciones. De esta forma, aun cuando las cápsides virales exhiben arquitecturas proteicas complejas, éstas pueden ser modificadas si conocemos sus propiedades estructurales (modelo cristalográfico). Con esta información y utilizando las nuevas herramientas computacionales para el diseño molecular, se pueden seleccionar mejores estrategias de funcionalización para una proteína viral y darle una nueva aplicación a las VLP (Ding et al., 2018; Kobayashi & Arai 2017).

Dependiendo de la estrategia que se utilice al trabajar con VLP, podemos llegar a realizar modificaciones en su estructura con una precisión a nivel molecular, algo que no se logra fácilmente con otras nanopartículas no biológicas. Por lo tanto, las cápsides se vuelven sistemas versátiles que pueden ser modificados en su superficie interna y externa para desempeñar nuevas funciones. Recientemente la

atención se ha centrado en las técnicas empleadas para modificar la estructura proteica de la cápside, lo que ha llevado al desarrollo de diferentes estrategias de funcionalización de proteínas, los cuales permiten el acoplamiento de diversos nanomateriales (Ding et al., 2018; Díaz et al. 2018; Mateu, 2016; Sapsford et al., 2013).

La funcionalización de las VLP comenzó por técnicas químicas de bioconjugación, las cuales se enfocaron en modificaciones covalentes para unir nuevas moléculas de interés. Las reacciones más comunes para modificar a las proteínas virales involucran a las cadenas laterales de algunos aminoácidos, los cuales proporcionan grupos reactivos que permiten formar enlaces covalentes. Uno de los aminoácidos más utilizados para la funcionalización dirigida, es la cisteína (Rohovie et al., 2017; Toita et al. 2013). La cisteína, puede estar presente naturalmente o introducirse por mutación en la superficie de las VLP. Debido a su grupo sulfhidrilo libre, la cisteína puede formar enlaces disulfuro de manera fácil y espontánea con otros ligandos que también contengan un grupo sulfhidrilo, en condiciones oxidantes. Sin embargo, el enlace disulfuro también se reduce fácilmente y puede no ser ideal para uniones a la superficie. Esta estrategia de fijación se ha utilizado para presentar péptidos en la superficie de VLP de varios virus, lo que ha permitido internalizarlos en células blanco, usarlos como sondas fluorescentes o unirles péptidos y proteínas heterólogas (Chatterji et al., 2004; Pomwised et al., 2016; Yao et al., 2015).

La lisina es otro aminoácido que se puede modificar químicamente gracias a la amina primaria de su cadena lateral. Usando reacciones denominadas reacciones de éster de *N*-hidroxisuccinimida (NHS) (porque el NHS se libera como parte de la reacción), se forman enlaces amida en los residuos de lisina expuestos a la superficie. La reacción ocurre espontáneamente entre pH 7.2 y 9. Esta estrategia de fijación ya se utilizó para presentar transferrina en VLP del fago de enterobacteria MS2, lo que podría permitir en un futuro que estas VLP traspasen la barrera hematoencefálica, un desarrollo que podría abrir una nueva biblioteca de terapias para trastornos neurológicos (Galaway & Stockley, 2013). Además, de esta forma se pueden unir otros compuestos, como PEG, péptidos, otras proteínas y sondas fluorescentes, sobre la superficie de las cápsides virales (Brunel et al., 2010; Chatterji et al., 2004; Gillitzer et al., 2002; Wu et al., 2012). Esta reacción es importante, ya que si se funcionaliza a las lisinas con una azida se las puede utilizar para “click-chemistry” (Strable et al., 2008).

Por último, la tirosina es un aminoácido que presenta una química compleja e interesante para funcionalizar VLP a través del acoplamiento de diazonio, la cual es una bioconjugación entre una anilina activada y una cadena lateral de tirosina (Ding et al., 2018; Díaz et al. 2018; Pokorski & Steinmetz, 2010). En el 2018 se desarrolló una nueva estrategia selectiva de bioconjugación, basada en residuos de tirosina a través de la química SuFEx (intercambio de fluoruro de azufre). Con esta técnica, se observó que las funciones de los péptidos y las proteínas se conservaron. Este método es muy adecuado para la modificación específica de residuos de proteínas

nativas y, por lo tanto, amplía la versatilidad de la bioconjugación en la química de proteínas (Choi et al., 2018).

Si bien la bioconjugación directa a residuos se ha demostrado con éxito en diversas nanopartículas, las ubicaciones naturales de los residuos requeridos, pueden no satisfacer las necesidades de una aplicación en términos de densidad de residuos, accesibilidad superficial, ubicación terciaria y reactividad competitiva. A pesar de que esto representa una gran desventaja para la técnica, actualmente este problema se puede compensar mediante la incorporación de aminoácidos nativos (o no nativos, como la homopropargilglicina y la azidohomoalanina) en las ubicaciones deseadas. Esto permite la unión de moléculas de interés en sitios específicos de la cápside viral y en la densidad deseada, como para las reacciones de click-chemistry (Lee et al., 2016; McKay & Finn, 2014). La click-chemistry se basa en reacciones con alto rendimiento, de amplio alcance, que crean solo subproductos que pueden eliminarse sin cromatografía, estereoespecíficos y que puedan realizarse en solventes fácilmente removibles o biocompatibles. Esta estrategia se basa principalmente en la formación de enlaces carbono-heteroátomo al utilizar reactivos cargados (Kolb et al., 2001).

Con todas las técnicas anteriores, se pueden unir ácidos nucleicos, polímeros y fármacos a las superficies internas o externas de las cápsides virales. Sin embargo, estas tienen sus limitaciones y por lo tanto se deben complementar con otras estrategias. Utilizando a la ingeniería genética, se puede tener un control preciso sobre el número, la posición y la distribución de las modificaciones incorporadas. Por consiguiente, la modificación genética sola o en combinación con técnicas de bioconjugación (como se describió anteriormente) se está convirtiendo rápidamente en una estrategia indispensable para diseñar VLP funcionales. Esta técnica, permite construir fácilmente nuevas proteínas mediante la inserción de la secuencia de un péptido o una proteína heteróloga, en un asa o en uno de los extremos amino o carboxilo terminales expuestos en la proteína viral. Como resultado, se pueden obtener VLP unidas de manera covalente a nuevos péptidos o proteínas, y sin las complicaciones e incluso limitaciones que llega a presentar la bioconjugación. Estas nuevas proteínas creadas mediante el diseño genético se conocen como quimeras proteicas, debido a que surgen de la unión de dos proteínas preexistentes que ya tienen una función por separado (Brune et al., 2016; Díaz et al. 2018; Mateu, 2011-2016)

Una vez que se elige la mejor estrategia para la optimización de las características del sistema de encapsulamiento de una VLP, también se tiene que considerar el tipo y el tamaño de la carga en relación con el tamaño de la cavidad interna. En este caso, se tiene que contemplar la posible fuga de la carga a través de los poros después de la encapsulación y las interacciones no específicas entre la carga y la superficie exterior de la VLP, lo que puede impedir una carga eficiente. Finalmente, también es importante considerar que la unión de proteínas de gran tamaño al

interior de las VLP puede alterar su autoensamblaje y estabilidad, por lo que la funcionalización del interior de la cápside viral se limita a péptidos pequeños.

## 2.4 Los parvovirus: clasificación y características de interés nanobiotecnológico

A pesar de que actualmente se pueden producir diversos tipos de cápsides virales en sistemas de expresión heterólogos (eucariontes), normalmente se suelen escoger aquellos virus con los que sea más fácil trabajar. Algunas de las características principales que se buscan en un virus que se usará para producir VLP son, que sea fácil de producir, purificar y que se puedan desensamblar y reensamblar in vitro. Esta última característica es la más importante si se pretende usar a las VLP como sistemas de transporte y entrega de fármacos o ácidos nucleicos (Pokorski & Steinmetz, 2011). Los factores que afectan el ensamblaje de las VLP pueden variar de un virus a otro. Sin embargo, se ha observado que aquellos más simples y de menor tamaño, suelen ser más fáciles de manejar y de reensamblar para fines prácticos (Liu et al., 2012).

Un tipo de virus que presenta estas características es la familia *Parvoviridae*. Estos virus han sido bastante estudiados por ser de interés clínico. Los virus que pertenecen a esta familia presentan cápsides icosaédricas muy pequeñas y relativamente simples (T=1), con DNA lineal de cadena sencilla, y sin envoltura lipídica, lo cual facilita su ensamble y desensamble en sistemas in vitro (Berns, 1990). Actualmente, los parvovirus se clasifican en dos subfamilias: *Parvovirinae*, que infecta a mamíferos y aves, y *Densovirinae*, que infecta a los artrópodos. Los miembros de la subfamilia *Parvovirinae* se dividen además en ocho géneros, de los cuales 5 son patógenos de humanos: *Erythroparvovirus* (parvovirus B19), *Dependoparvovirus* (virus adenoasociado), *Protoparvovirus* (bufavirus), *Amdoparvovirus*, *Bocaparvovirus* (bocavirus humano), *Aveparvovirus*, *Copiparvovirus*, y *Tetraparvovirus*. Por otra parte, los miembros de la subfamilia *Densovirinae* se dividen en cinco géneros: *Ambidensovirus*, *Brevidensovirus*, *Hepandensovirus*, *Iteradensovirus* y *Penstyldensovirus* (Cotmore et al., 2014).

Los parvovirus de la subfamilia *Parvovirinae* son muy buenos candidatos para desarrollar VLP, ya que infectan a una gran variedad de mamíferos, entre ellos los humanos, por lo que también están mejor caracterizados. La mayoría de las cápsides de esta subfamilia están compuestas únicamente por 2 proteínas: VP1 y VP2, las cuales tienen secuencias idénticas, excepto por una región adicional en el extremo amino terminal de VP1 (VP1u). En algunas especies, la proteína VP2 puede sufrir un corte proteolítico cerca de su extremo amino terminal para producir a la proteína VP3, la cual es necesaria para el ensamblaje final de estas cápsides (Agbandje et al., 1995; Rogo et al., 2014). Su genoma tiene aproximadamente 5 kb de longitud y presenta, en ambos extremos, secuencias palindrómicas que autohibridan y forman diferentes estructuras de horquilla (dependiendo de la

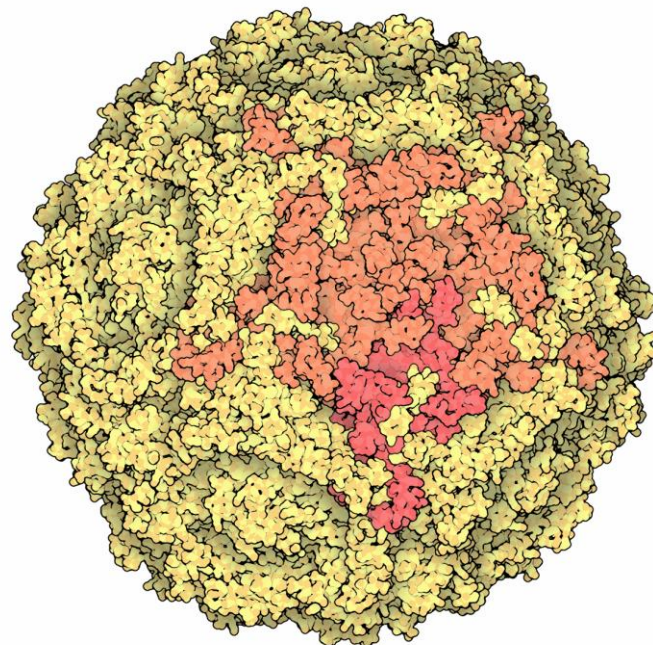
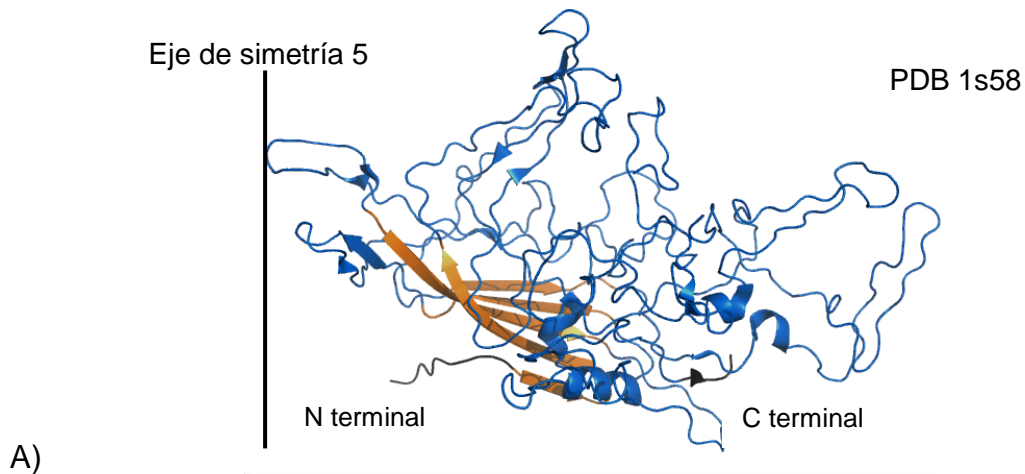
especie), las cuales se conocen como repeticiones terminales invertidas o ITR. Este genoma normalmente contiene dos marcos de lectura abiertos (ORF). El ORF1 codifica para proteínas no estructurales y el ORF2 codifica dos o tres proteínas estructurales (VP) que ensamblan la cápside viral; Las proteínas VP comparten un codón de terminación común (Tu et al., 2015).

Estos virus, presentan varias ventajas estructurales, ya que se ha demostrado que pueden producirse VLP in vitro perfectamente funcionales utilizando únicamente a la proteína VP2 (Sánchez-Rodríguez et al., 2012; Santillán-Urbe et al., 2015). Por otra parte, al tener cápsides con diámetros de entre 20 y 26 nm, pueden entrar hasta el núcleo celular a través de sus poros, los cuales permiten el paso de moléculas con un diámetro menor a 39 nm. De esta manera, la entrega de su material genético es directa y eficiente, siendo este un factor importante si se les quiere utilizar como herramientas para terapia génica (Ganaie & Qiu 2018; Mäntylä et al., 2017). Para el proceso de infección celular, las cápsides reconocen e ingresan a la célula blanco a través de su interacción con receptores específicos que inducen la endocitosis. En las primeras etapas de la vía endocítica, las vesículas de la membrana plasmática se dirigen hacia los endosomas tempranos. La maduración de endosomas tempranos a tardíos se da con la disminución del pH, seguida de la formación de estructuras multivesiculares agrandadas. Posteriormente, la fusión de estas estructuras con un lisosoma genera un organelo híbrido transitorio (endolisosoma), que en poco tiempo se convierte a un lisosoma clásico (Mäntylä et al., 2017).

Evidentemente, al no tener una envoltura lipídica, estos virus no pueden escapar del sistema endosomal mediante la fusión de membranas. En su lugar tienen un dominio con actividad de fosfolipasa (PLA2) en la región VP1u, que permite su escape del endosoma al citoplasma celular. La activación de esta fosfolipasa depende de la disminución del pH endosomal; esto además genera un cambio estructural en la cápside que permite la salida del extremo amino terminal de la proteína VP1 (Mani et al., 2006). Esto último se comprobó en estudios con B19, donde observaron que las cápsides recombinantes son reconocidas fácilmente por un anticuerpo monoclonal específico de VP1u, mientras que las cápsides silvestres no. Pero al someter a las cápsides silvestres a un pH bajo, observaron que su región VP1u se vuelve accesible al anticuerpo. Estos resultados revelan una diferencia principalmente conformacional entre el virus silvestre y el recombinante, y nos muestra que la región VP1u está originalmente ubicada dentro de la cápside. Además, en otros parvovirus también se ha observado que el N-terminal de VP1 se expone durante el tráfico endosómico, lo que también indica que inicialmente está oculto en la cápside viral (Harbison, et al 2008; Ros et al., 2006; Tu et al., 2015).

Uno de los parvovirus utilizados frecuentemente para la experimentación con sistemas basados en VLP es justamente el PB19, el cual, al ser un virus de interés clínico, ha sido muy estudiado. Su cápside (Fig. 3 A) tiene una estructura icosaédrica formada por 60 subunidades, de las cuales el 95% es la proteína viral 2

(VP2; 58 kDa) y el otro 5% es la proteína viral 1 (VP1; 83 kDa). Al igual que otros representantes de la familia *Parvoviridae*, su proteína VP1 consiste de la secuencia completa de VP2 más una región adicional en su extremo amino terminal, la cual tiene 227 aminoácidos. La proteína VP2 del PB19 tiene una estructura de barril  $\beta$  antiparalelo, compuesta por ocho láminas interconectadas por grandes asas que se proyectan a la superficie externa y de esta forma determinan su topografía y estructuras específicas en los ejes de simetría de 5, 3 y 2 (Fig. 3 B) (Heegaard & Brown, 2002; Ozawa & Young, 1987).



**Figura 3.** Estructura del parvovirus B19. A) En la imagen se muestra una cápside y la conformación de un eje de simetría 5 (marcado en color naranja/rojo), el cual está compuesto por 5 subunidades proteicas (en color rojo esta una). B) Modelo de la proteína VP2, donde se muestra la estructura de barril  $\beta$  antiparalelo (naranja) y los extremos N y C terminal respectivamente. Imágenes modificadas a partir del trabajo de Goodsell et al., (2015) The RCSB PDB "Molecule of the Month": Inspiring a Molecular View of Biology.

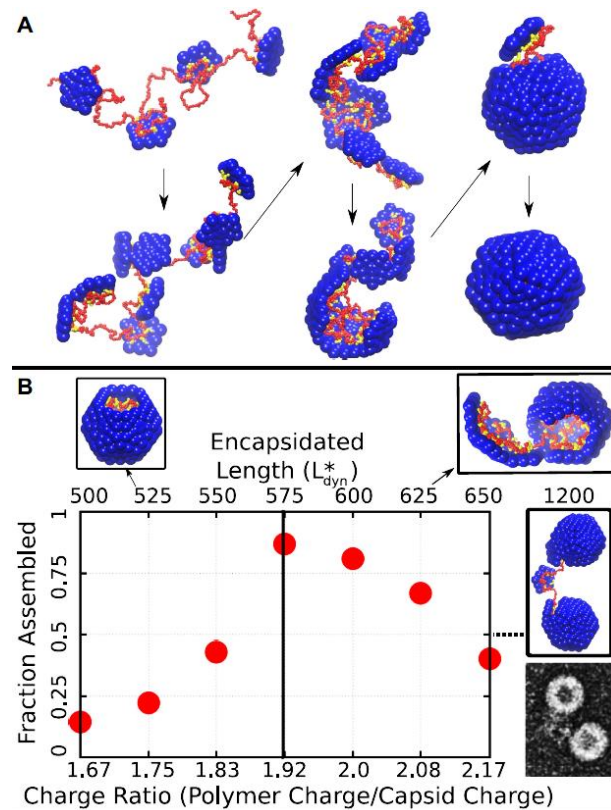
Al ser similar a otros parvovirus, su cápside presenta una estructura cilíndrica en los ejes de simetría cinco, la cual forma un poro que conecta al interior con el exterior y cuyo borde está rodeado por una depresión tipo "cañón". En estudios previos, se ha observado que, en el virión, el extremo amino terminal de la proteína VP2 puede quedar expuesto en la superficie adyacente al poro que se forma en el eje de simetría de orden cinco. Esta posición simétrica de la proteína, sugiere que es espacialmente posible que todos los extremos amino terminales en estas zonas, sean externalizados al mismo tiempo (Cayetano et al., 2018; Kaufmann et al., 2008; Rogo et al., 2014).

Finalmente, en cuanto al proceso de empaquetamiento del material genético de los parvovirus, este sigue siendo un tema complejo y bastante discutido. Los avances que se han hecho en relación a este tema son pocos y un tanto dispersos. Por una parte, se ha observado que al menos en el género *Protoparvovirus*, existe un bolsillo o "pocket" de unión a ssDNA conservado, que reconoce a una secuencia específica de su genoma (600 nt). Esta región de ssDNA se ordena en el pocket en una conformación específica, que también se conserva en todos los parvovirus del género. Así mismo, se sabe que el material genético está estabilizado por dos cationes divalentes que están coordinados entre los fosfatos de nucleótidos y residuos de VP (Halder et al., 2013). Sin embargo, también se ha observado que en unos cuantos parvovirus existe un mecanismo de ayuda para el empaquetamiento del material genético, dependiente de la proteína NS1. En este caso se propone que el ssDNA se introduce en una cápside preensamblada en una dirección de 3' a 5', probablemente a través de la actividad de helicasa de un oligómero peptídico NS1. El resto de la cadena se bombea a la partícula bajo presión creciente, adoptando una topología que permitirá que se desenrede posteriormente en una dirección de 3' a 5'. (Cotmore & Tattersall, 2013-2014).

## **2.5 Mecanismos de ensamblaje y características de los virus de cadena sencilla**

La formación de un virus es un logro extraordinario de la naturaleza y la evolución, en donde una gran cantidad de subunidades de proteínas y otros componentes se ensamblan en un medio celular atestado, para formar estructuras ordenadas, completas y reproducibles en escalas de tiempo biológicamente relevantes. Para los virus, el ensamblaje de su cápside alrededor de su genoma es un paso esencial en su ciclo de vida. Por lo tanto, es de gran importancia el poder identificar y entender los factores que determinan que una cápside viral se pueda unir de manera eficiente y selectiva a su genoma. El tener esta información permite identificar blancos moleculares para desarrollar nuevos medicamentos antivirales que bloqueen o afecten la formación de viriones infecciosos. Por otra parte, el tener una mejor idea de cómo participa la estructura de los ácidos nucleicos y las proteínas en el proceso de ensamblaje, mejorará la capacidad para rediseñar proteínas virales y genes humanos para aplicaciones de terapia génica o entrega (Perlmutter et al., 2013).





**Figura 4.** Simulación por dinámica browniana del ensamblaje de una cápside alrededor de un polielectrolito lineal en concentración fisiológica de sal. A) Proceso de ensamblaje, subunidades con 5 cargas positivas en cada ARM (color amarillo), alrededor de un polielectrolito lineal (rojo) con 600 segmentos. B) Fracción de cápsides completas en función de la longitud del polímero (eje superior) o la relación de cargas (eje inferior). La imagen pertenece al trabajo de Perlmutter y colaboradores (2015).

En los virus monocatenarios, el genoma suele ser esencial para el ensamblaje, ya que las interacciones subunidad-subunidad son demasiado débiles para favorecer la formación de cápsides vacías (Fraenkel-Conrat y Williams 1955). Las subunidades primero se adsorben al material genético en una forma desordenada, hasta que se unen las suficientes para formar un núcleo crítico (estructura a partir del cual se ensambla la cápside). Una vez que se forma este núcleo, se agregan subunidades adicionales en forma secuencial y reversible, hasta que se completa la cápside (Fig. 4A). Este proceso se da principalmente por interacciones electrostáticas entre los grupos fosfato del ácido nucleico y los aminoácidos básicos de las proteínas virales. Los motivos de unión a DNA/RNA de las proteínas virales suelen estar ubicados en extremos flexibles conocidos como motivos ricos en arginina o ARM, por sus siglas en inglés. Actualmente se sabe que, para muchos virus monocatenarios, existe una correlación directa entre la carga neta de sus ARM y la longitud total de su genoma (Fig. 4B). Esta relación de cargas óptima normalmente se encuentra cerca del orden 2-1, donde la carga negativa (DNA/RNA) sobrepasa a la positiva (proteínas), lo que nos indica que estos virus están 'sobrecargados' negativamente (Hu et al., 2008; Perlmutter et al., 2013).

La rigidez y la alta densidad de cargas en el dsDNA o dsRNA impiden su encapsulación espontánea. Por lo tanto, muchos de estos virus ensamblan primero su cápside vacía (pro-cápside) y posteriormente introducen su material genético, utilizando un motor molecular que hidroliza ATP. Esto genera que el material genético de estos virus esté altamente compactado bajo una enorme presión. En el caso de los virus icosaedricos, la longitud de su genoma y, por lo tanto, la cantidad de proteínas que puede codificar, está limitada por el requisito de que pueda ser almacenada en su cápside. Por esta razón, la mayoría de estos virus contienen genomas con una o unas pocas secuencias de proteínas estructurales, ordenadas de manera compacta e inclusive en diferentes marcos de lectura para aprovechar al máximo el espacio (Chelikani et al., 2014; Sun et al., 2010).

En el caso de los virus monocatenarios, el determinante principal para que una cápside viral se autoensamble correctamente es la longitud termodinámica óptima ( $L_{eq}$ ) del ácido nucleico que va almacenar, ya que, a través de simulaciones con modelos de ensamblaje dinámico, se demostró que, conforme más cerca se esté de la longitud óptima del ácido nucleico, la proporción de cápsides correctamente ensambladas será mayor. La longitud termodinámica óptima de un ácido nucleico, se refiere a la longitud necesaria que debe tener para minimizar la energía libre del complejo ácido nucleico-cápside. Si el ácido nucleico está por encima o por debajo de la  $L_{eq}$ , el rendimiento baja debido a que los capsómeros no se incorporan por completo cuando el ensamblaje de la cápside está por terminar (Fig. 4A). La  $L_{eq}$  depende de un conjunto de parámetros estructurales de la cápside y del ácido nucleico, junto con la fuerza iónica del medio. Estos parámetros son, el volumen de la cápside, la carga en su superficie interna, la relación de cargas óptima y el porcentaje de bases apareadas del ácido nucleico. Por lo tanto, la  $L_{eq}$  de un ácido nucleico es un punto crítico si se busca desarrollar un sistema de almacenamiento y transporte basado en partículas virales (Perlmutter et al., 2013).

El parámetro estructural que juega el papel más importante en la determinación de la  $L_{eq}$  es el tamaño de la cápside viral, por la sencilla razón, de que conforme más grande es la cápside, más grande es su capacidad de almacenamiento y, por lo tanto, será mayor la longitud que podrá tener el ácido nucleico a encapsular. Otro parámetro estructural que afecta a la  $L_{eq}$  de un ácido nucleico, es el número de cargas positivas en la superficie interna de la cápside viral, lo que a su vez se correlaciona con la relación de cargas entre ambas moléculas. Mediante simulaciones con modelos de ensamblaje dinámico, se observó que la  $L_{eq}$  aumenta de forma sublineal al aumentar la carga de la cápside. Por consiguiente, tenemos que por cada carga adicional en los ARM (60 cargas adicionales si se considera un virus T=1), también se incrementa la longitud del ácido nucleico encapsulado, pero en una proporción menor, lo que conduce a una disminución en la relación de cargas óptima. Esto ocurre de manera similar cuando el aumento en las cargas positivas se da en regiones rígidas de la superficie interna de la cápside. Es importante mencionar que, aun cuando disminuya la relación de cargas entre el

ácido nucleico y la cápside, esta nunca será igual o menor a uno. Si bien las cargas electrostáticas son un factor importante, el volumen ocupado por el material genético y la longitud de sus segmentos que no están interaccionando con los ARM también afectan la longitud del material que se puede encapsidar (Perlmutter et al., 2013; Perlmutter & Hagan 2015).

Los ácidos nucleicos tienen distintas características que determinan su capacidad de empaquetamiento al interior de una cápside. Estas características incluyen el tamaño, forma y rigidez de la molécula, lo que a su vez tienen que ver con su estructura secundaria y terciaria predefinida. El papel que desempeña la estructura secundaria y terciaria de un ácido nucleico monocatenario depende de su patrón de bases apareadas. Este patrón es específico de cada molécula, y varía en función del porcentaje de nucleótidos con bases apareadas, la frecuencia relativa de horquillas o uniones de orden superior en la estructura y la longitud máxima de la estructura secundaria. Con base en esto, se sabe que conforme aumenta el porcentaje de bases apareadas, la  $L_{eq}$  del ácido nucleico también se incrementa. Lo anterior indica que el emparejamiento de bases contribuye significativamente a la cantidad de material genético que se puede empaquetar. Este efecto puede explicarse por el hecho de que las interacciones nucleótido-nucleótido neutralizan algunas repulsiones de cargas en el ácido nucleico y dan como resultado estructuras más compactas, en comparación con otras moléculas con las mismas longitudes, pero con un menor porcentaje de bases apareadas. Por lo tanto, los ácidos nucleicos encapsulados se ven afectados por interacciones intramoleculares que modifiquen su volumen, repulsiones electrostáticas y penalizaciones de entropía conformacional durante el ensamblaje (Garmann et al., 2015; Low & Weeks, 2010).

Por último, la fuerza iónica del medio es un factor que también modifica a la  $L_{eq}$  de un ácido nucleico y su relación de cargas óptima con la cápside. La  $L_{eq}$  es mayor conforme aumenta la fuerza iónica de la solución. Esto es debido a que las moléculas de RNA o DNA monocatenario están naturalmente en una conformación extendida, impuesta por la repulsión de cargas intramoleculares. Sin embargo, al incrementar la fuerza iónica del medio, estas moléculas son relajadas a un estado de mayor flexibilidad y compactación por el apantallamiento electrostático de los iones. La fuerza iónica varía dependiendo de las características de los iones en solución y si son monovalentes o divalentes (Bloomfield, 1997; Takamoto et al., 2004).

El hecho de que la formación de una cápside lleve a una estructura más ordenada reduce la entropía traslacional de sus subunidades constituyentes y, por lo tanto, para su formación, requiere de interacciones favorables que superen esta penalización. En muchos casos, el ensamblaje de una cápside puede superar esta penalización mediante las interacciones hidrofóbicas o electrostáticas que se dan entre subunidades (del Alamo & Mateu 2005). Es importante entender que, al encapsular el material genético, se produce una sobrecarga porque solo una fracción de los segmentos de este último interactúan directamente con las cargas

positivas de la cápside. En consecuencia, el empaquetado de múltiples fragmentos pequeños de un ácido nucleico, solo conducirá a una sobrecarga mínima o nula, ya que no quedarán regiones libres de este último. Por lo tanto, no se favorecerá termodinámicamente el proceso de ensamblaje, e incluso lo puede impedir (Perlmutter et al., 2013; Perlmutter & Hagan 2015).

Como ya se mencionó, dependiendo del tipo de material genético que contengan los virus, van a tener distintos mecanismos de formación de sus cápsides. Para las cápsides vacías, Prevelige y colaboradores (1993) propusieron un mecanismo de ensamblaje de 'nucleación y crecimiento'. Este mecanismo se basa en una cinética de polimerización, en la cual primero hay una etapa de nucleación (energéticamente menos favorable y dependiente de la concentración de subunidades libres) donde se forma un núcleo crítico, seguido de una fase de crecimiento, en la que una o varias subunidades se suman secuencialmente hasta que se completa la cápside. El núcleo crítico se define como la estructura intermedia más pequeña, con una probabilidad superior al 50% de crecer hasta convertirse en una cápside completa y no desarmarse. Los intermediarios más pequeños son transitorios y menos estables, por lo que la formación de un núcleo crítico es un evento raro, cuya duración es dependiente del tamaño del núcleo y de la concentración de las subunidades proteicas. En contraste, los intermediarios en la fase de crecimiento son relativamente estables y las adiciones sucesivas de subunidades están más favorecidas, por lo que su tiempo de ensamblaje tiene una menor dependencia de la concentración de las subunidades libres (Hagan, 2010; Mateu, 2013).

Debido a la geometría de la estructura icosaédrica, los primeros intermediarios tienen relativamente pocos contactos subunidad-subunidad y por esta razón, son más inestables. El núcleo crítico a menudo corresponde a una estructura pentagonal, cuya geometría maximiza el número de interacciones. En algunos casos, tras la formación del polígono, hay cambios conformacionales en las subunidades proteicas que pueden resultar en una estabilización adicional. Esto suele ser más común en cápsides  $T=3$  o superiores. A medida que la concentración de subunidades libres disminuye o al tener una menor energía libre de unión subunidad-subunidad, los intermediarios pequeños se vuelven menos estables y aumenta el tamaño del núcleo crítico. Mediante dinámicas moleculares se ha observado que, a medida que la concentración de subunidades disminuye en el transcurso de una reacción de ensamblaje, el tamaño crítico del núcleo aumenta, acercándose asintóticamente a una media cápside (Hagan, 2014).

Debido a todo lo anterior, las cinéticas de ensamblaje de las cápsides, ya sea medidas por experimentos o calculadas a partir de modelos teóricos o computacionales, son sigmoidales. Tienen una fase "lag" inicial durante la cual se forman los núcleos críticos, seguida de una fase rápida de polimerización. De manera paralela, surge una tendencia asintótica hacia el equilibrio, durante la cual, el ensamblaje se ralentiza a medida que aumentan las barreras de nucleación

debido al agotamiento de las subunidades libres. Por este motivo, al aumentar la concentración de subunidades o la intensidad de las interacciones entre éstas (generalmente al disminuir el pH o aumentar la concentración de sal) se promueve un ensamblaje más rápido. (Whitelam & Jack, 2015)

En las cinéticas de ensamblaje viral, existe una compensación o “trade-off” entre la especificidad de las interacciones y la accesibilidad cinética. Así, entre más específicas sean las interacciones, más se incrementa la selectividad del ensamblaje hacia la estructura objetivo, pero al mismo tiempo disminuye la tasa de ensamblaje debido a la disminución de otros factores cinéticos. Dependiendo de la especificidad de interacción, estos factores cinéticos se pueden clasificar en 5 tipos:

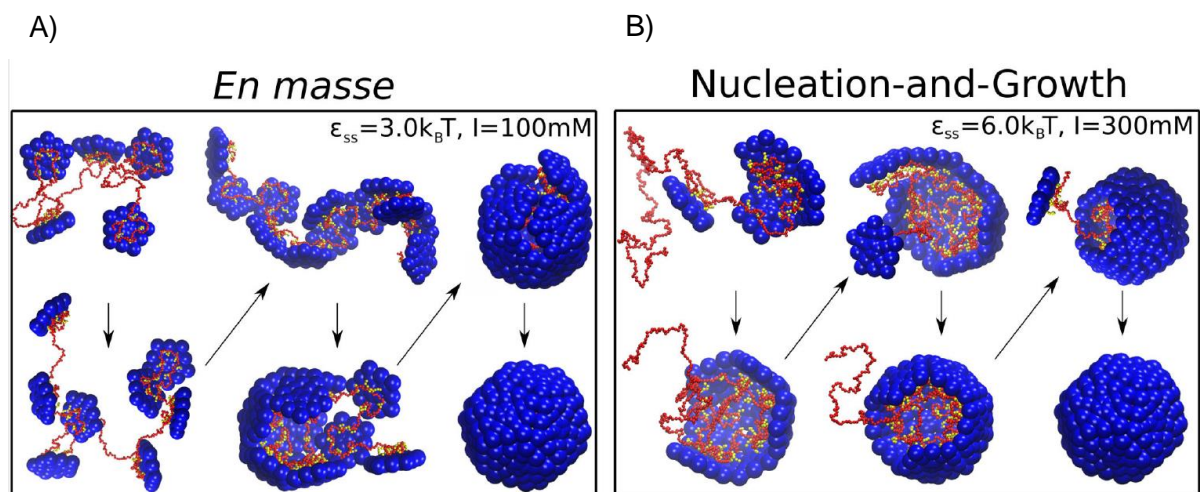
(1) En los casos donde las interacciones son débiles o la concentración de subunidades está por debajo de una concentración crítica de subunidades ( $c^*$ ), el ensamblaje es desfavorable en el equilibrio. (2) Cuando las interacciones o la concentración de subunidades aumenta ligeramente por encima de  $c^*$ , el ensamblaje es favorable, pero experimentalmente no ocurre en escalas temporales relevantes debido a grandes barreras de nucleación. (3) Cuando el aumento de las interacciones o de la concentración de subunidades es aún mayor, se favorecen barreras de nucleación moderadas y se obtienen grandes rendimientos de cápsides bien formadas en escalas de tiempo relevantes experimentalmente (Lutomski et al., 2018; Perlmutter & Hagan 2015; Zlotnick et al., 1999-2000). Finalmente, un incremento demasiado alto de las interacciones entre subunidades conduce a rendimientos pobres, debido a dos formas de trampas cinéticas. (4) Trampa cinética por inanición de subunidades libres: cuando la nucleación es más rápida en comparación al crecimiento, se generan demasiados núcleos en los primeros tiempos y las subunidades libres se agotan antes de que un número significativo de cápsides se ensamble. (5) Trampa cinética por malformación: bajo interacciones suficientemente fuertes, las subunidades con orientaciones imperfectas quedan atrapadas en grupos en crecimiento por adiciones subsiguientes de subunidades, lo que lleva a cápsides defectuosas cerradas que carecen de simetría icosaédrica o estructuras malformadas abiertas (Lutomski et al., 2018; Perlmutter et al., 2013).

A partir de este punto, es importante tener claro cuáles son todos los factores involucrados en el ensamblaje de una cápside viral. Para recapitular, estos son: la concentración de subunidades proteicas y del ácido nucleico, así como su longitud óptima, la fuerza de las interacciones subunidad-subunidad (controladas por el pH, la fuerza iónica y la secuencia de proteínas), y la fuerza de las interacciones subunidad-polímero (controladas por la fuerza iónica y las cargas en los ARM). Teniendo claras estas consideraciones, ahora podemos pasar a los mecanismos de ensamblaje de una cápside con su material genético.

A través de simulaciones por dinámicas moleculares, se ha observado que hay dos clases de mecanismos de ensamblaje. Uno se parece mucho al mecanismo de

nucleación y crecimiento encontrado para el ensamblaje de cápsides vacías, con la diferencia de que el material genético estabiliza las interacciones proteína-proteína y puede mejorar el flujo de proteínas hacia el ensamblaje de la cápside (Fig. 5B). En este mecanismo, un pequeño pseudo-núcleo se une primero al material genético, lo que induce a la fase de crecimiento en la que una o varias subunidades se suman de forma secuencial y reversible, hasta formar la cápside (Hu & Shklovskii, 2007).

El otro mecanismo fue propuesto originalmente por McPherson en el 2005. En este, las subunidades se adsorben al material genético en masa y de manera desordenada, posteriormente se reorganizan de manera cooperativa para formar una cápside ordenada (Fig. 5A). Por simulaciones se ha predicho que uno de los mecanismos puede favorecerse sobre el otro, dependiendo de las condiciones de la solución y las interacciones proteína-proteína de la cápside. El mecanismo de nucleación y crecimiento es favorecido por una interacción débil proteína-polímero (alta fuerza iónica) y por interacciones fuertes proteína-proteína (típicamente pH bajo), mientras que el mecanismo en masa surge al tener interacciones débiles proteína-proteína y por interacciones fuertes proteína-polímero (baja fuerza iónica). Aquí es importante aclarar que, debido a la gran diversidad de proteínas virales y sus características, es muy probable que en algunas el pH tenga un efecto inverso sobre la fuerza de las interacciones entre subunidades (Perlmutter & Hagan, 2015).



**Figura 5.** Modelos propuestos para el ensamblaje de una cápside en interacción con un polielectrolito. A) En condiciones de baja fuerza iónica y pH alto (interacciones débiles proteína-proteína). B) En condiciones de alta fuerza iónica y pH bajo (interacciones fuertes proteína-proteína). La imagen es un resultado y pertenece al trabajo de Perlmutter y Hagan (2015).

En relación a esto, el trabajo experimental de algunos grupos de investigación concuerda en que algunas VLP pueden ensamblarse a través del mecanismo en masa (Cadena-Nava et al., 2012; Garmann et al., 2014). Esto fue porque encontraron que el ensamblaje in vitro de las cápsides del virus moteado clorótico del chícharo, era más eficiente cuando se realizaba en dos pasos. Al basarse en los factores determinantes del ensamblaje que ya mencionamos, encontraron que en condiciones con poca sal (interacciones proteína-RNA fuertes) y pH neutro

(interacciones proteína-proteína débiles), las proteínas experimentan una adsorción extensa pero desordenada sobre el RNA. Posteriormente, al reducir el pH se mejora la unión proteína-proteína, lo que lleva a la formación de cápsides bien ensambladas (Garmann et al., 2014-2012).

## 2.6 Los péptidos de unión a ácidos nucleicos y las protaminas

El estudio de las interacciones entre los péptidos de unión a DNA y el RNA ha sido particularmente importante para aquellos interesados en el reconocimiento molecular de estos. Se ha encontrado que diversos péptidos reflejan con precisión el mecanismo de unión de proteínas que unen a ácidos nucleicos, pero son lo suficientemente pequeños y simples como para permitir una disección extensa de las interacciones intermoleculares. Por lo tanto, proporcionan información relevante para el diseño de moléculas o fármacos pequeños de unión a DNA o RNA. Los péptidos de unión a ácidos nucleicos se definen como polipéptidos cortos (40 aminoácidos), que a menudo presentan conformaciones estructurales distintas entre su estado libre o unido, pasando generalmente de una estructura desordenada a una ordenada, al unirse con el material genético (Das & Frankel, 2003).

Para el ensamblaje de las cápsides virales alrededor de su genoma, estas se suelen guiar por señales de empaquetamiento en este último (reconocimiento de secuencias o estructuras específicas). Sin embargo, como se mencionó en la sección anterior, la presencia de estas señales no garantiza el empaquetamiento exclusivo del genoma viral. Las proteínas virales cuentan con péptidos de unión a ácidos nucleicos conocidos como ARM o motivos ricos en arginina. Los ARM son péptidos extendidos, que comúnmente se encuentran en el extremo N-terminal de las proteínas virales. Estos son altamente flexibles y tienen regiones no estructuradas de diferentes longitudes, no obstante, las cápsides de virus envueltos poseen estas regiones no estructuradas, pero sus ARM no están extendidos (Ni & Kao, 2013).

Los ARM están involucrados en una amplia gama de funciones biológicas: su naturaleza desordenada es esencial para promover el correcto ensamblaje de la cápside y la encapsidación del genoma, y al ser ricos en residuos cargados positivamente, también pueden controlar el tamaño de las partículas ensambladas, mientras que su eliminación puede evitar el ensamblaje nativo de la cápside (Lošdorfer Božič & Podgornik, 2018). Aunque se los conoce como un motivo, los ARM generalmente no tienen una estructura conservada y se ha demostrado que, dependiendo de su composición, al unirse al DNA o RNA pueden obtener una conformación específica. Existen varios tipos de conformaciones que estos pueden adquirir, siendo las más comunes las estructuras en  $\alpha$ -hélice, pero también los hay con estructuras de lámina  $\beta$  o incluso en conformación extendida (Das & Frankel, 2003; Iwazaki et al., 2005).

Las secuencias de aminoácidos que componen a los ARM muestran poca o ninguna conservación y son estructuralmente dinámicas, de manera que no pueden ser fácilmente detectadas por secuencias comunes o comparaciones de estructuras. Como resultado, se desconoce la aparición y distribución de estos ARM en todo el universo viral. A través del cálculo de la carga neta de segmentos discretos de proteínas, se han identificado proteínas que contienen tramos de aminoácidos con una carga neta alta. En los virus icosaédricos, estos segmentos discretos de proteínas están enriquecidos con un sesgo distintivo hacia la arginina sobre la lisina. Con base en lo anterior, Requião y colaboradores (2020), encontraron una correlación positiva para un grupo de 17 familias virales, que corresponde al 40% de todas las familias con estructuras icosaédricas descritas hasta la fecha. Sus datos indican que virus no relacionados, y con diversos tipos de genoma, adoptan un mecanismo subyacente común para el ensamblaje de la cápside basado en los ARM. Por lo tanto, las VLP, al estar formados por estas mismas proteínas, conservan esta capacidad. Tanto el material genético como alguna otra molécula de interés, con cargas similares, se pueden cargar dentro de las VLP por interacciones electrostáticas no específicas. (Díaz et al., 2018).

A pesar de ello, no todos los virus icosaédricos basan su ensamblaje y encapsulación del material genético en los ARM. Por lo que, si se busca desarrollar una VLP a partir de este otro tipo de virus, o simplemente para desarrollar nanopartículas virales más eficientes para la encapsulación de material genético heterólogo, estas se tienen que funcionalizar con péptidos de unión a DNA/RNA. Los virus utilizan diversas estrategias para neutralizar las cargas en su genoma, que incluyen el secuestro de cationes divalentes, el uso de péptidos ricos en poliaminas como la espermina y la espermidina, e incluso pequeñas proteínas básicas ricas en arginina y lisina que unen ácidos nucleicos con alta afinidad. Lo más notable entre estos últimos son las proteínas similares a las protaminas y las histonas que son ubicuas del núcleo de eucariontes (Bideshi et al., 2018). Las proteínas similares a protaminas se encuentran principalmente en espermatozoides de varias especies, que van desde esponjas hasta anfibios, y comprenden el grupo más heterogéneo de proteínas nucleares básicas en espermatozoides. Estas proteínas tienen un mayor contenido de lisina y arginina (35-50%) que las histonas, y son considerablemente más grandes (~200 aminoácidos) que las proteínas designadas como protaminas verdaderas (Balhorn, 2007).

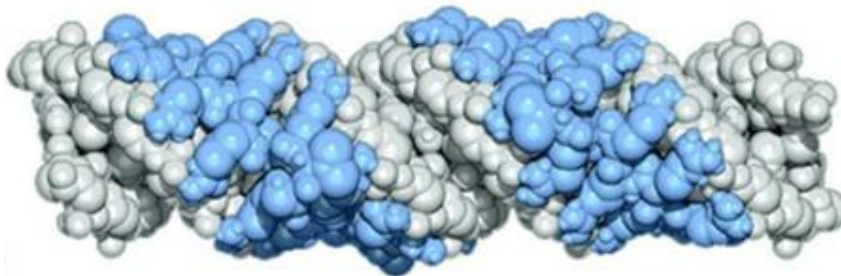
Por otro lado, las protaminas verdaderas son uno de los sistemas proteicos más eficientes para condensar DNA que existe en la naturaleza, estas pertenecen a una familia de proteínas pequeñas y ricas en arginina. Son sintetizadas en las espermátidas maduras de muchos animales y plantas, ya que, al tener una gran afinidad por el DNA, ayudan a condensar el genoma espermático en un estado genéticamente inactivo. Los vertebrados tienen de 1 a 15 genes de protamina por genoma haploide, que se agrupan en un mismo cromosoma. Estudios previos sugieren que esta familia de proteínas evolucionó a partir de histonas



especializadas, que pasaron a ser proteínas tipo protamina y posteriormente a las protaminas verdaderas (Balhorn, 2007).

Los elementos estructurales presentes en todas las protaminas verdaderas, son una serie de motivos de unión a DNA ricos en arginina (a menudo contienen una mezcla de residuos de arginina y lisina en protaminas que no son de mamíferos) y sitios de fosforilación múltiple. Las protaminas desempeñan un papel esencial para el almacenamiento, condensación y protección del DNA en el núcleo de los eucariontes. Esta es una función comparable a la de varias proteínas virales, como las de los poliomavirus, virus del herpes y retrovirus (La Bella & Vesco, 1980; Imai et al., 2014; Jeng et al., 2015; Segura et al., 2008). Si bien las protaminas son un sistema eficiente para condensar el material genético, estas presentan un tamaño relativamente grande como para unirlos directamente con las proteínas virales, ya que esto reduciría enormemente la capacidad de carga de la partícula viral. Por esta razón es importante entender cómo funcionan las protaminas, y analizar cuáles son los aminoácidos esenciales para cumplir su función; ya que esto nos permitirá encontrar las secuencias mínimas para cumplir su función y poder acoplarlos a los sistemas virales (Wang et al., 2010; Wilson et al., 1987; Wilson & Price, 1988).

En el caso de la protamina P1, los residuos de arginina que comprenden los motivos de unión a DNA generalmente se agrupan en el centro de la molécula en una serie de "dominios de anclaje" a DNA. Estos dominios de anclaje, típicamente contienen de 3 a 7 residuos de arginina y usualmente están separados por uno o más aminoácidos no cargados. Los aminoácidos entremezclados que enlazan los dominios de anclaje parecen funcionar como una bisagra, lo que permite que los dominios de anclaje se envuelvan alrededor del surco mayor de la hélice de DNA y optimicen las interacciones que se forman entre cada residuo de arginina y los fosfatos cargados negativamente en el esqueleto fosfodiéster de las dos cadenas de DNA (Figura 6). Cada molécula de protamina P1 se une a 10-11 pb del DNA, mientras que la protamina P2 se une a un segmento de DNA ligeramente mayor (alrededor de 15 pb). Esta unión neutraliza la carga negativa a lo largo del esqueleto fosfodiéster del DNA y permite que las moléculas de DNA adyacentes se puedan condensar aún más (Balhorn, 2007).



**Figura 6.** Modelo de interacción DNA-protamina. En la imagen se muestra cómo dos protaminas adyacentes (átomos azules) envuelven a una hélice de DNA (átomos blancos) a través de su surco mayor. Imagen tomada del trabajo de Ballhorn (2007).

### 3. ANTECEDENTES

Para poder ocupar a las VLP como sistemas de almacenamiento y entrega de ácidos nucleicos, es necesario favorecer la accesibilidad de la carga a la cavidad interna de estas partículas, por lo cual es importante la optimización de las características del sistema de carga o encapsulamiento. Por otra parte, deben ser compatibles tanto la estabilidad de las VLP como la de su carga en condiciones de almacenamiento y aplicación. Debido a lo anterior, es bastante útil conocer los trabajos recientes sobre modificaciones del interior de las cápsidas que pueden usarse para ayudar al encapsulamiento de moléculas dentro de las VLP y comparar las características de cada sistema.

En la naturaleza, la superficie de la cavidad interior de los virus a menudo muestra una afinidad intrínseca hacia su molécula de carga natural, lo que permite la encapsulación de moléculas con propiedades similares. En este caso, podemos encontrar virus que tienen superficies internas cargadas positivamente, las cuales al interactuar con las cargas negativas de los ácidos nucleicos promueven el autoensamble de los capsómeros alrededor de su carga natural (RNA / DNA) y mejoran su estabilidad. En el trabajo de Voronkova et al. (2007), este mecanismo se aprovechó para encapsular un plásmido no nativo, cargado negativamente en VLP del poliomavirus de hámster. Por otra parte, en el trabajo de Lu et al. (2012) utilizaron VLP del virus del mosaico del pepino (CMV), las cuales solo se estabilizan y ensamblan por las interacciones proteína-RNA. Este estudio demostró que las VLP también se forman al interactuar y encapsular ssDNA y dsDNA, además pudieron encapsular un fluoróforo unido a DNA.

A pesar de lo anterior, existen virus que no tienen como tal una cavidad interna cargada positivamente, por lo que suelen tener regiones específicas con la capacidad de reconocer su propio DNA/RNA. Este es el caso de los parvovirus, los cuales tienen un genoma de DNA monocatenario de aproximadamente 5 kb de longitud y a la fecha se ha encontrado que para encapsularlo, utilizan estrategias distintas a las ya mencionadas. Esto los vuelve sistemas poco útiles para la encapsulación de otros ácidos nucleicos. Sin embargo, estas partículas pueden tener características deseadas para su uso como vectores de entrega, por lo que uno puede modificarlas mediante reacciones químicas o genéticas para facilitar la encapsulación de ácidos nucleicos u otras moléculas de interés con características similares.

Como ejemplo de una modificación química tenemos al trabajo de Toita et al. (2013), en el cual sustituyeron una glicina por una cisteína en parte interna de la proteína multimérica de choque térmico, Hsp, de *Methanococcus jannaschii*. Posteriormente, utilizaron al fármaco DOX-EMCH, un análogo de DOX que posee un grupo maleimida y un enlace de hidrazona susceptible a lisis ácida, para

fusionarlos por reacciones de adición de Michael entre el grupo maleimida del DOX-EMCH y las cisteínas del nanocontenedor.

En cuanto a modificaciones genéticas, tenemos el trabajo de Hernández-García et al. (2014), en el cual crearon una VLP de novo al diseñar una proteína con características similares a las proteínas virales. A esta proteína se le añadió un péptido de unión inespecífico a DNA compuesto por 12 lisinas. Ellos pudieron observar que esta proteína unía al DNA y además formaba estructuras similares a cápsides virales. Otro trabajo es el de Natilla et al. (2015) en el cual trabajaron con VLP del finovirus de maíz rayado (MRFV). Este virus se compone de dos proteínas CP1 y CP2. Generaron mutantes de la primera alterando un motivo que posiblemente participa en la unión a DNA en el extremo N-terminal (compuesto por 37 aminoácidos). Este virus tiene la capacidad de reconocer y encapsular únicamente su material genético, sin embargo, al realizar las mutaciones, afectaron su especificidad y pudieron encapsular otros ácidos nucleicos. En este trabajo también concluyeron que una mayor carga positiva en el interior de la cápside promueve la encapsulación de ácidos nucleicos de manera no selectiva.

Además de utilizar péptidos para unir ácidos nucleicos, también existe la posibilidad de utilizar proteínas especializadas para esta función. Un ejemplo de eso fue el trabajo realizado también por Hernández-García y colaboradores en el 2017, en el cual usaron ahora una proteína de unión a DNA. Con esta desarrollaron una proteína multimérica que recubre el DNA, llamada C8-BSso7d. Ellos observaron que esta proteína se une y cubre con alta especificidad y afinidad a moléculas de DNA y nanoestructuras plegadas tipo origami. Sin embargo, el uso de proteínas de unión a ácidos nucleicos tiene sus inconvenientes si se planea fusionarlas a una proteína viral, ya que esto afectaría la capacidad de almacenamiento de la partícula y también podría afectar el plegamiento de la proteína viral. Por lo tanto, la alternativa más viable para este tipo de proyecto es la funcionalización con péptidos de unión a ácidos nucleicos.

Nosotros nos basamos en el trabajo de Brewer et al. (2003) para seleccionar un péptido con una buena capacidad para unir y condensar DNA. En su trabajo, ellos analizaron las constantes cinéticas de condensación y descondensación de péptidos tipo protamina y los compararon con las constantes de la protamina P1. En este trabajo, probamos si era posible posicionar este péptido al interior de las VLP para que el sistema encapsule DNA durante el ensamble de las VLP de PB19.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

La superficie de la cavidad interior de las cápsides a menudo muestra una afinidad intrínseca hacia su molécula de carga natural, lo que permite la encapsulación de moléculas con propiedades similares. Por lo general, las cápsides virales tienen regiones o motivos ricos en aminoácidos con cargas positivas en la superficie interna, de tal forma que sus interacciones electrostáticas con ácidos nucleicos cargados negativamente mejoran el autoensamble de las subunidades y su estabilidad. Este mecanismo ha sido explotado para encapsular moléculas heterólogas cargadas negativamente dentro de las VLP. Sin embargo, no todas las cápsides virales tienen esta característica; existen algunas que muestran mecanismos de carga por interacción más complejos para la encapsulación de su material genético nativo. Estas otras cápsides presentan interacciones específicas entre algunas regiones de su superficie interior y las secuencias únicas de su material genético nativo.

Este es el caso particular de los parvovirus, en los cuales se ha observado que tienen la capacidad de reconocer su propio DNA monocatenario y lo hacen mediante interacciones secuencia-específicas con las bases nitrogenadas (no con los grupos fosfato como los virus mencionados previamente), principalmente mediante puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas (Halder et al., 2013). Esto ocasiona que las VLP de estos virus no puedan encapsular DNA heterólogo de manera aleatoria o por interacción, por lo que es necesario considerar la optimización de las condiciones para el proceso de encapsulamiento que favorezcan la interacción con la carga molecular. Por lo que, en este proyecto, proponemos modificar a la proteína VP2 del parvovirus B19 de humano, para desarrollar cápsides con una alta afinidad por los ácidos nucleicos y con una mayor eficiencia para su encapsulamiento in vitro.

Para cumplir este objetivo, modificaremos a la proteína VP2 para que presente un motivo derivado de un péptido tipo protamina que ha sido previamente descrito en la literatura (RRRRRRFDRRRRRR o R6FGR6), y que presenta una alta afinidad por DNA ( $K_d = 9.5 \times 10^{-9}$  M). Dichos motivos, deberán quedar en el interior de las VLP para que faciliten el encapsulamiento de estas moléculas. El extremo N-terminal de la proteína VP2 en las VLP de este virus puede estar expuesto en la superficie de las mismas, al salir por un poro formado en la cápside viral. Por lo tanto, proponemos truncar este extremo y en su lugar incluir el motivo de unión a ácidos nucleicos. Por otra parte, el extremo C-terminal de la proteína VP2 está naturalmente expuesto en la cara interna de la cápside y ahí también se puede fusionar el motivo de unión a ácidos nucleicos.

## 5. HIPÓTESIS

Al acoplar el péptido derivado de protamina (R6FGR6) en el extremo amino o carboxilo terminal de la proteína VP2 del parvovirus B19, se obtendrán proteínas quiméricas capaces de participar en el ensamble de VLP. Estas partículas presentarán el péptido R6FGR6 en su interior y serán capaces de compactar y encapsular DNA monocatenario.

## 6. OBJETIVOS

### Objetivo general

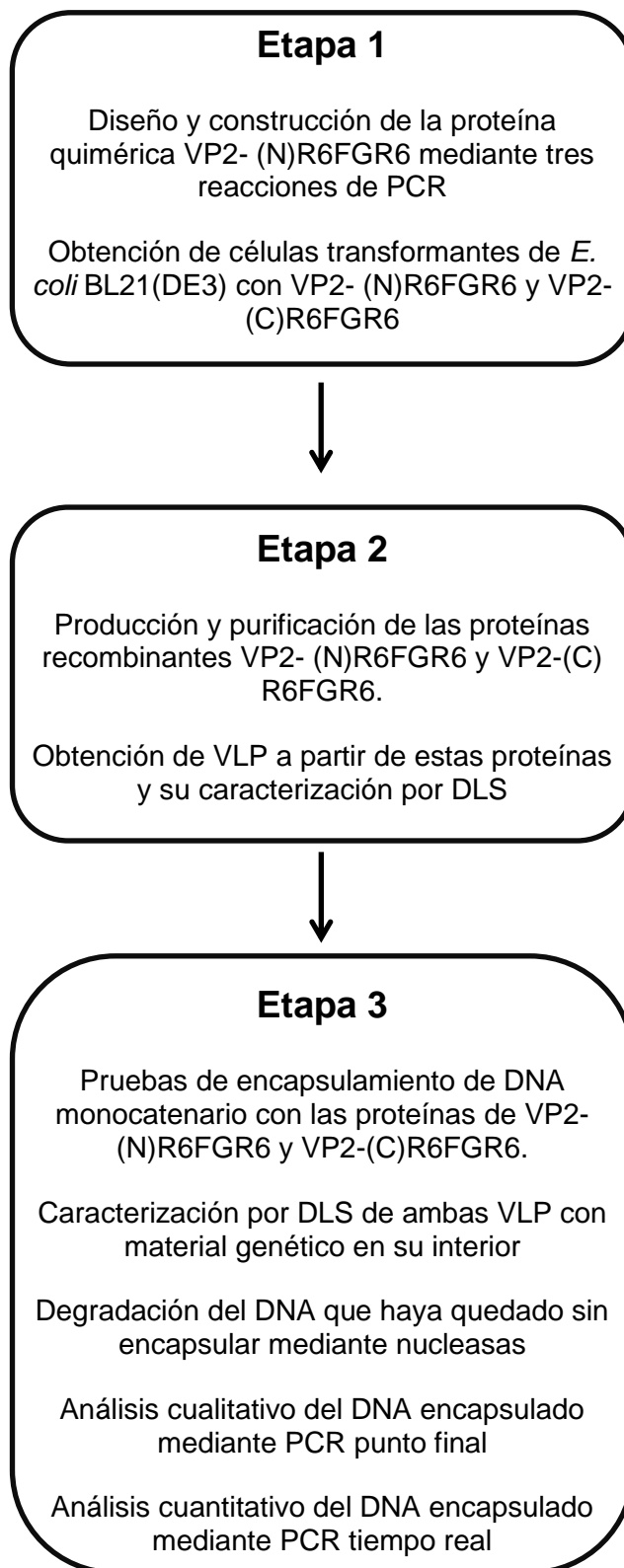
Construir VLP del parvovirus B19 que desplieguen el péptido R6FGR6 en su interior y demostrar su funcionalidad para encapsular material genético.

### Objetivos particulares

1. Diseñar y construir las quimeras de VP2 con el péptido R6FGR6 en su extremo N- o C-terminal.
2. Estudiar la expresión de los genes quiméricos VP2-(N)R6FGR6 y VP2-(C)R6FGR6 en *E. coli*, y purificar las proteínas quiméricas.
3. Estudiar el ensamble de VLP con las proteínas purificadas de VP2-(N)R6FGR6 y VP2-(C)R6FGR6, y caracterizarlas por métodos hidrodinámicos.
4. Probar que las proteínas VP2-(N)R6FGR6 y VP2-(C)R6FGR6 son funcionales mediante su interacción con DNA y su posterior encapsulamiento a través de la formación de VLP.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Esquema general de trabajo



## 7.2 Materiales

### Reactivos químicos

Reactivo	Marca
Acetato de potasio	Sigma
Ácido acético glacial	Sigma
Ácido clorhídrico	Sigma
Ácido etilendiamino tetracético (EDTA)	Sigma
Agar bacteriológico	Sigma-Aldrich
Agarosa UltraPure™	Invitrogen
Albumina	Sigma
Ampicilina	Sigma-Aldrich
Bromuro de etidio	Sigma
Clorhidrato de guanidina (GdnHCl)	J.T. Baker
Cloroformo	Sigma
Cloruro de magnesio (MgCl <sub>2</sub> )	Thermo Scientific™
Cloruro de potasio (KCl)	Sigma
Cloruro de sodio (NaCl)	Sigma
Cutsmart (Amortiguador para digestión enzimática)	New England Biolabs
Dimetil sulfóxido (DMSO)	Sigma
DNA polimerasa de alta fidelidad (HFP)	Thermo Scientific™
dNTP Mix	Thermo Scientific™
Dodecilsulfato de sodio (SDS)	Sigma
Etanol	Sigma
Fenol saturado de amortiguador	Sigma
Fosfato de potasio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma
Fosfato de sodio dibásico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Sigma
Fosfato de sodio monobásico (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma
Glicerol	Gibco BRL
Glucosa	Sigma
Hidróxido de sodio (NaOH)	Sigma
Imidazol	Fluka
Isopropanol	Sigma
Isopropil 1-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG)	Sigma
L-Arginina	Sigma
DNA ligasa de T4	New England Biolabs
Lisozima	Sigma
Medio LB (Luria-Bertani)	Sigma
Metanol	Química Delta
Membrana para diálisis	Sigma
Matriz para cromatografía de afinidad	Protino™ Ni-TED
Matriz para cromatografía de exclusión molecular	Sephacryl S-500 HR
RNAsa	Thermo Scientific™
Sulfato de Níquel (NiSO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich
Tris-HCl	Sigma
Triton X-100	Sigma
1,4-Dithiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich

## Instrumentos y equipo

Instrumento o equipo	Marca
Amicon Ultra-15 (30 kDa)	Millipore
Balanza analítica BP 221S	Sartorius
Centrifuga refrigerada RC 6+	Thermo Scientific Instruments
Centrifuga refrigerada 5702 R	Eppendorf
Cromatógrafo de líquidos de alta resolución	Waters
Espectrofluorómetro	ISS
Espectrofotómetro CARY 400	Varian
Fuente de poder PS 500XT	Hofer Scientific Instruments
Microcentrifuga refrigerada 5418	Eppendorf
Micro pipetas (1, 2.5, 10, 100, 200, 1000)	Eppendorf/Gilson
Microscopio de fuerza atómica innova	Veeco
Potenciómetro pH 700	Oakton
Sonicador CPX 750	Cole Parmer
Speed Vac SC110	Savant
Trans-iluminador UV T1203	Sigma
Termociclador T100™	BIO RAD
Termomixer confort	Eppendorf
Vortex	Gilson
Zetataiser $\mu$ V	Malvern Instruments

## Cepas utilizadas

Cepa	Genotipo	Referencias
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> (rB <sup>-</sup> , mB <sup>-</sup> ), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , $\lambda$ (DE3), Cmr.	-Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986) <i>J. Mol. Biol.</i> 189, 113–30. -Davanloo, P. <i>et al.</i> (1984) <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 81, 2035–9.
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F- 80dlacZ M15 ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk <sup>-</sup> , mk <sup>+</sup> ) <i>phoAsupE44 -thi-1 gyrA96 relA1</i>	-Woodcock, D.M., Crowther, D.M., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z., and Graham, M.W., <i>Nucl. Acids Res.</i> (1989) 17, 3469-347

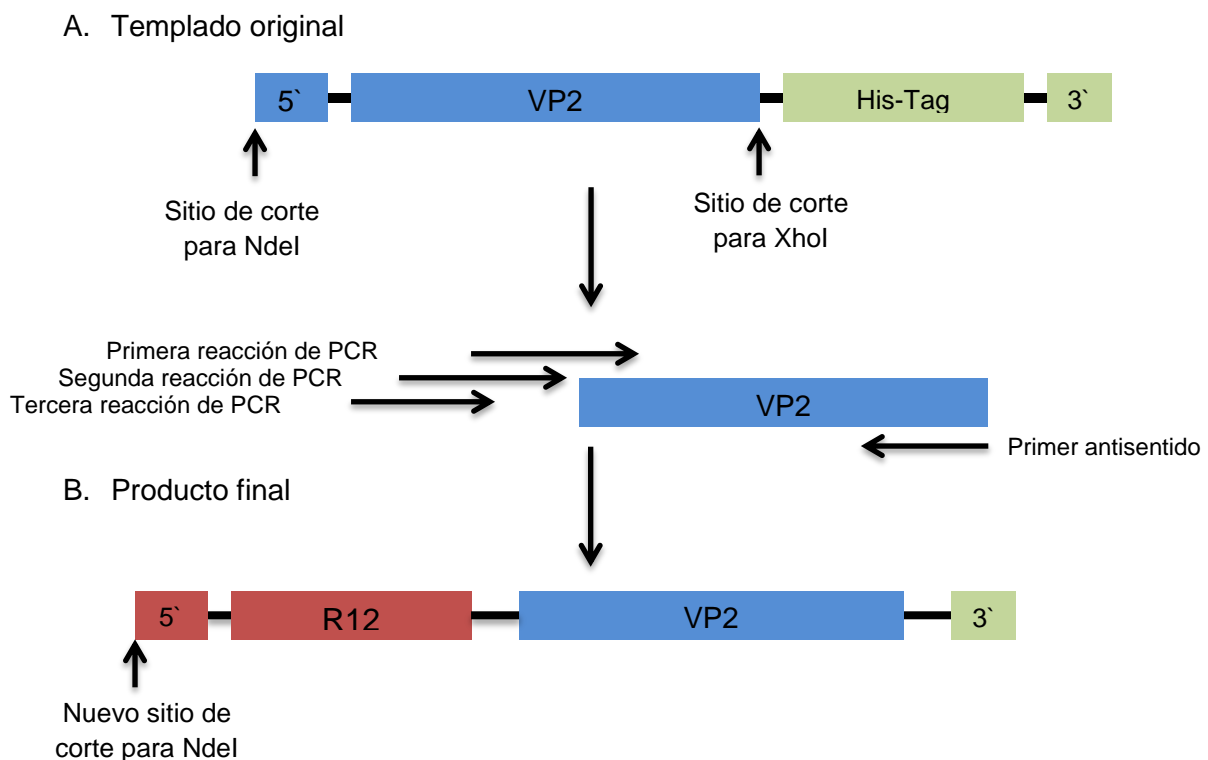
## 7.3 Métodos

### 7.31 Diseño y construcción de la proteína quimérica VP2-R6FGR6

La incorporación de la secuencia que codifica para el péptido R6FGR6 (RRRRRRFGRRRRRR, en lo sucesivo R12 para su simplificación) en el extremo 5' del gen de la proteína VP2 se realizó mediante 3 PCRs (Figura 7). Se diseñaron y



sintetizaron cuatro cebadores (Tabla 1), con los cuales se fueron adicionando los nucleótidos que conforman la secuencia del péptido R12 y el sitio de corte para su posterior clonación. Para esto se utilizaron como referencia las secuencias del péptido R12 (Brewer et al., 2003) y de la proteína VP2, con la cual se trabaja en el laboratorio de fisicoquímica e ingeniería de proteínas. En este caso se decidió diseñar los cebadores para cortar 20 aminoácidos del extremo amino terminal de la proteína, esto fue para asegurarnos que el péptido R12 quede al interior de la cápside. Por último, esta proteína contiene en su extremo carboxilo terminal una etiqueta de histidinas (6x His-Tag) utilizada para facilitar su purificación mediante columnas His-trap®.



**Figura 7.** Proceso de construcción del gen VP2R12(N) A) Secuencia original de VP2 a la cual se le realizaron los 3 PCRs. B) Secuencia terminada del gen VP2-12 con un nuevo sitio de corte para *NdeI*.

**Tabla 1.** Secuencias de los cuatro cebadores (uno antisentido y tres sentido) que se utilizaron para realizar las PCRs. Los nucleótidos de color naranja conforman la estructura del R12 y los de color azul dan lugar a la nueva secuencia de corte para *NdeI*.

Cebador antisentido	Cebador sentido	Reacción de PCR
5' CAGTGGTGGTGGTGGTGGT 3'	5' TCGCCGTAGACGTGAAAAGAGCATGTGG 3'	1ª
	5' CATATCGGTAGACGTCGTCGTCGTTTCGGT CGTCGTCGCCGTAGACGTGA 3'	2ª
	5' CGCCTGAACGAACATATGCGTAGAC 3'	3ª

Para obtener el templado sobre el cual se realizaron las reacciones de PCR, se realizó la extracción del DNA plasmídico de una colonia de *E. coli* DH5 $\alpha$ , la cual contenía al vector pET-22b(+) con el gen que codifica para la proteína VP2. Para esto se utilizó el kit Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep de Jena Bioscience, de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Para incorporar la secuencia del péptido R12 en el gen de la proteína VP2, se utilizó el plásmido purificado como templado para la primera reacción de PCR, para esto se emplearon las siguientes condiciones:

Reactivo	Volumen (Concentración)
H <sub>2</sub> O	38 $\mu$ L
10X amortiguador para <i>Taq</i> sin MgCl <sub>2</sub>	5 $\mu$ L (200 $\mu$ M de MgSO <sub>4</sub> )
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 $\mu$ L (1.5 mM)
dNTP mix (25 mM c/u)	1 $\mu$ L (500 $\mu$ M de c/u)
Cebador sentido (PCR1)	1 $\mu$ L (0.2 $\mu$ M)
Cebador antisentido	1 $\mu$ L (0.2 $\mu$ M)
Templado	0.5 $\mu$ L
<i>Taq</i> DNA polimerasa	0.25 $\mu$ L (1.25 unidades)
Volumen final	50 $\mu$ L

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	1:00 min	1
Desnaturalización	95°C	30 s	30
Alineamiento	60°C	1:00 min	
Extensión	68°C	1:30 min	
Extensión final	68°C	5:00 min	1

El producto obtenido de la reacción se analizó en un gel de agarosa (1%) para comprobar que se hubiera amplificado correctamente el gen de interés. Debido a que el número de nucleótidos agregados era muy pequeño, esperábamos que tuviera un tamaño similar al gen de VP2 (1700 bp). Para la segunda PCR, se utilizó como templado el producto obtenido del primer PCR y se llevó a cabo la reacción con las siguientes condiciones:

Reactivo	Concentración
H <sub>2</sub> O	38 $\mu$ L
10X amortiguador para <i>Taq</i> sin MgCl <sub>2</sub>	5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 $\mu$ L (1.5 mM)
dNTP mix (25 mM c/u)	1 $\mu$ L (500 $\mu$ M de c/u)
Cebador sentido (PCR2)	1 $\mu$ L (0.2 $\mu$ M)
Cebador antisentido	1 $\mu$ L (0.2 $\mu$ M)

Templado	0.5 µL
Taq DNA polimerasa	0.25 µL (1.25 unidades)
Volumen final	50 µL

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	1:00 min	1
Desnaturalización	95°C	30 s	30
Alineamiento	61°C	1:00 min	
Extensión	68°C	1:30 min	
Extensión final	68°C	5:00 min	1

El producto obtenido de la reacción se analizó en un gel de agarosa (1%) para comprobar si se amplificó el gen de interés. Para la tercera PCR, el producto obtenido de la segunda reacción se purificó mediante el Kit de extracción por gel de agarosa (Jena Bioscience), de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Una vez purificado se utilizó como templado y se llevó a cabo la reacción con las siguientes condiciones:

Reactivo	Concentración
H <sub>2</sub> O	38 µL
10X amortiguador para Taq sin MgCl <sub>2</sub>	5 µL
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 µL (1.5mM)
dNTP mix (25 mM c/u)	1 µL (500 µM de c/u)
Cebador sentido (PCR1)	1 µL (0.2 µM)
Cebador antisentido	1 µL (0.2 µM)
Templado	0.5 µL
Taq DNA polimerasa	0.25 µL (1.25 unidades)
Volumen final	50 µL

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	1:00 min	1
Desnaturalización	95°C	30 s	30
Alineamiento	60°C	1:00 min	
Extensión	68°C	1:30 min	
Extensión final	68°C	5:00 min	1

Una vez que se obtuvo el producto del tercer PCR, se le realizó una digestión con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* para generar los extremos cohesivos necesarios para su ligación con el vector. Posteriormente se purificó mediante el kit de extracción por gel de agarosa (Jena Bioscience), de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

De igual manera, para obtener el vector libre se procedió a cortar el DNA plasmídico previamente extraído con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*, las cuales solo tienen un sitio de corte dentro del vector pET-22b(+), con lo cual se liberó el gen de la proteína VP2 y al mismo tiempo se obtuvo el vector linealizado. Posteriormente se purificó el vector mediante el kit de extracción por gel de agarosa (Jena Bioscience), de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

Una vez obtenidos el inserto y el vector purificados, se llevó a cabo la reacción de ligación bajo las siguientes condiciones:

Reactivo	Concentración
H <sub>2</sub> O	4.75 µL
DNA Ligasa de T4 (5 Weiss U/µL)	0.25 µL (1.25 unidades Weiss)
Amortiguador para DNA ligasa (10X)	2 µL
Vector pET-22b(+) digerido	10 µL (~40 ng)
Inserto (VP2R12(N))	3 µL (~40 ng)
Volumen final	20 µL

La reacción se dejó durante 12 h a 16° C.

### 7.32 Sobreexpresión de la proteína recombinante VP2R12(C)

Las condiciones empleadas para la sobreexpresión de la proteína VP2R12(C) fueron distintas a las reportadas previamente por el grupo de investigación. El protocolo con las modificaciones realizadas se presenta a continuación:

#### **Protocolo para la sobreexpresión de la proteína recombinante VP2R12(C)**

1. Se preparó un primer inóculo en 10 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) a partir de una colonia aislada de *E. coli* BL21(DE3). Este se incubó a 37°C, con agitación orbital de 250 r.p.m. durante 3 h.
2. Una vez que pasó el tiempo, este inóculo se transfirió a un matraz con capacidad de 200 mL que contenía 100 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) y se incubó a 37°C, con agitación orbital de 250 r.p.m. hasta que alcanzó su fase exponencial (DO600 = 0.6 a 0.8).

3. En este punto se le adicionó una solución de IPTG a una concentración final de 0.2 mM para inducir la sobreexpresión de la proteína. El matraz se dejó en incubación a 37°C, con agitación orbital de 200 r.p.m. durante 16 h más.
4. Transcurrido el tiempo de inducción se procedió a recuperar la biomasa por centrifugación a 6000 r.p.m. por 8 min a 4°C. Se tomó una muestra pequeña para determinar la presencia de la proteína mediante SDS-PAGE.
5. El pellet celular se resuspendió nuevamente en una solución de NaCl al 0.9% (m/v) para eliminar el medio de cultivo remanente de las células. La biomasa se volvió a centrifugar como en el paso 4.

### 7.33 Obtención de la proteína VP2R12(C) en cuerpos de inclusión

Como la proteína VP2R12(C) es muy similar en su estructura a la proteína silvestre de VP2 y a que en trabajos previos del grupo de investigación se demostró que esa proteína y otras quimeras forman cuerpos de inclusión, se decidió emplear un protocolo de obtención y limpieza de cuerpos de inclusión. Debido a que la proteína VP2R12(C) tuvo una alta afinidad por el DNA celular, el protocolo tuvo que irse rediseñando conforme se encontraban las mejores condiciones para la obtención de la proteína.

#### **Protocolo de obtención y limpieza de la proteína VP2R12(C)**

1. Para un pellet obtenido de un volumen total de 400 mL, se le re suspendió en 30 mL de una solución con fuerza iónica alta (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 M NaCl, 0.5% v/v Triton-X100, 5 mM EDTA, pH 8.0). En esta solución se procedió a realizar la lisis celular mediante sonicación. Se realizaron 3 pulsos de 20 s, con pausas de 1 min entre cada uno y usando una amplitud al 45%.
2. Después de esta etapa, se centrifugó el lisado a 10000 r.p.m. durante 10 min a 4°C. El pellet que se obtuvo se resuspendió en 20 mL de solución con fuerza iónica alta (sin Triton-X100), y se volvió a sonicar dos veces más como en el paso 1.
3. Una vez lisadas las células, se las centrifugó a 10000 r.p.m. durante 15 min a 4°C. El pellet que se obtuvo se resuspendió en 20 mL de solución de lavado (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 M NaCl, pH 8), y se agitó de forma manual por 5 min. Pasado este tiempo se volvió centrifugar a 10000 r.p.m. durante 15 min a 4°C.
4. El pellet que se obtuvo nuevamente se resuspendió en 20 mL de solución de lavado y se repitió el paso 3. El pellet obtenido al final de los lavados se resuspendió en 30 mL de una solución para solubilizar los cuerpos de inclusión (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 5 M Gdn-HCl, pH 8).
5. Para aumentar la eficiencia de este proceso, se incubó a 37°C, con agitación orbital de 220 r.p.m. durante 12 h.

6. Por último, para eliminar los remanentes de proteína agregada se volvió a centrifugar la solución a 10000 r.p.m. durante 20 min a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo.

### 7.34 Purificación de la proteína recombinante VP2R12(C)

La purificación de la proteína VP2R12(C) se realizó mediante cromatografía de afinidad, para lo cual se utilizó una matriz Protino™ Ni-TED que cuenta con iones metálicos inmovilizados (IMAC, por sus siglas en inglés). Para esto, la proteína VP2R12(C) se diseñó con una etiqueta de histidinas en su extremo amino terminal, lo cual permitió su interacción con los iones de níquel presentes en la matriz. Las columnas de purificación empleadas funcionan a través de gravedad y cuentan con un volumen de 20 mL. El protocolo para equilibrar la matriz y purificar de la proteína fue el siguiente:

#### **Protocolo de purificación de la proteína VP2R12(C)**

1. La columna fue equilibrada con un volumen de 30 mL de una solución amortiguadora A (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 3 M Gdn-HCl, pH 8).
2. Ya equilibrada la columna, se pasó un volumen de 5 mL de la solución con la proteína solubilizada VP2R12(C). Una vez que entró a la columna, se adicionó un volumen de 10 mL de solución amortiguadora A, para distribuir la proteína a través de toda la matriz y se la dejó interaccionar con la resina por 15 min.
3. Con la proteína unida a la matriz se pasó un volumen de 25 mL de una solución amortiguadora W (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 M NaCl, 3 M Gdn-HCl, pH 8), para favorecer la liberación de ácidos nucleicos unidos a la proteína VP2R12(C) y algunas proteínas con baja afinidad por la matriz.
4. Una vez que la solución W entró a la columna, se le adicionó un volumen de 20 mL de la solución amortiguadora A, para retirar a la otra solución de la columna.
5. Después se realizó un segundo lavado (ahora de proteínas no específicas), para lo cual se adicionó un volumen de 20 mL de la solución amortiguadora W-2 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 3 M Gdn-HCl, Imidazol 15 mM, pH 7.5).
6. Finalmente, para eluir a la proteína se adicionó un volumen de 30 mL de la solución amortiguadora E (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 3 M Gdn-HCl, Imidazol 300 mM, pH 7). Para esto se recolectó un volumen muerto de 10 mL y después se comenzó a recolectar el volumen restante en fracciones (5 en total).
7. Las fracciones obtenidas se analizaron mediante SDS-PAGE para saber en cuáles se encontraba la proteína y descartar las demás. Las fracciones con la proteína se juntaron en un tubo Falcon de 50 mL y posteriormente se las concentró mediante un Amicon Ultra-15 (30 kDa) para filtración con centrifuga.
8. Una vez que se obtuvo la proteína concentrada y con un mayor grado de pureza, se le cambió el amortiguador E por el R (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 M Gdn-HCl, 1 mM DTT), nuevamente mediante un Amicon Ultra-15.

Con la proteína en el nuevo amortiguador, se le determinó su concentración por espectrofotometría a una longitud de onda de 280 nm. Se usó como referencia una curva de calibración obtenida a partir de disoluciones de albúmina sérica bovina (BSA) solubilizada en la solución amortiguadora R. Todos los puntos de la curva fueron preparados por triplicado, con un volumen final de 1000  $\mu$ L.

### 7.35 Pruebas de ensamble y caracterización de VLP con base en la proteína VP2R12(C) mediante DLS

Para encontrar las condiciones de ensamble de las cápsides virales a partir de la proteína VP2R12(C), fue necesario dializarla frente a distintas soluciones de replegamiento para eliminar el agente desnaturante (Gdn-HCl). Se encontraron buenos resultados usando un amortiguador de alta fuerza iónica ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mM, NaCl 1 M, pH 7.4) y también con uno con base en KCl ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20 mM, KCl 350 mM, L-Arginina 200 mM, pH 7.4). Para preparar el ensamble, se diluyó la proteína purificada con más solución R y se la llevó a una concentración de 0.6 mg/mL, en un volumen final de 1 mL. La muestra se dejó en diálisis durante un periodo total de 40 h a una temperatura de 5°C, con poca agitación.

Para determinar que se hayan formado las VLP, los ensambles fueron analizados en un equipo Zetasizer  $\mu$ V (Malvern instruments) por dispersión dinámica de luz (DLS por sus siglas en inglés). La dispersión dinámica de luz es una técnica basada en los principios del movimiento browniano y el efecto Doppler, mediante los cuales se determina el tamaño y la masa de las partículas que se encuentran en suspensión. Los parámetros para el análisis fueron fijados por el equipo en 1.33 para el índice de refracción, 1.003 cP para la viscosidad y 20°C para la temperatura. Se utilizó una celda de vidrio con capacidad para un volumen de 500  $\mu$ L. Antes de analizar las muestras en el DLS se pasaron por cartuchos de filtración con un tamaño de poro de 0.45  $\mu$ m y después por cartuchos de filtración con un tamaño de poro de 0.22  $\mu$ m

### 7.36 Ensayos del cambio en la movilidad electroforética (EMSA)

El ensayo de cambio en la movilidad electroforética o EMSA, es una técnica útil para la identificación y caracterización de interacciones de proteínas con ácidos nucleicos. Este ensayo proporciona un método eficiente para estudiar proteínas de unión a DNA o RNA. Para analizar a la proteína VP2R12(C) en interacción con DNA, se usó el protocolo desarrollado por Ream y colaboradores en el 2016:

#### **Protocolo para el ensayo del cambio en la movilidad electroforética**

1. Se pusieron a dializar varios ensambles de la proteína VP2R12(C) a distintas concentraciones (en las condiciones previamente mencionadas), junto con dsDNA (25 bp) a una concentración final de 1.5  $\mu$ M para obtener distintas relaciones molares.
2. Después de las 40 h se analizaron los ensambles por DLS para comprobar que estos hubieran formado VLP del tamaño esperado.
3. La interacción se analizó mediante un gel de agarosa en condiciones no desnaturizantes al 1%, preparado con amortiguador  $K_2HPO_4$  50 mM (pH 7.5). El volumen vertido de agarosa en el molde fue de 20 mL.
4. El gel se corrió en una plataforma de electroforesis de estilo submarino en solución amortiguadora  $K_2HPO_4$  50 mM a un voltaje de 50 V por 40 min. Después de la electroforesis, el gel se tiñó durante 25 minutos con agitación suave en una solución de bromuro de etidio que se creó al diluir 10  $\mu$ L del stock de bromuro de etidio en 50 mL de amortiguador  $K_2HPO_4$  50 mM
5. Una vez teñido el gel, se retiró la solución de bromuro de etidio y se le agregó nueva solución de  $K_2HPO_4$  50mM para lavar el exceso de bromuro de etidio. Se puso en agitación por 10 min.
6. Finalmente, el gel fue observado en un transiluminador UV para poder observar las interacciones con el DNA.

### 7.37 Cuantificación por espectrofluorometría del DNA encapsulado en las VLP de VP2R12(C) a partir de EMSA

Para analizar la fracción mayoritaria de proteína (VLP) observada en los EMSA y comprobar que realmente contenía DNA, esta fue aislada del gel de agarosa mediante un corte, abarcando solo la fracción mayoritaria donde se detectó proteína (no se cortó la zona que presentaba fluorescencia por el bromuro de etidio). La banda se disolvió en un amortiguador de fosfatos ( $Na_2HPO_4$  20 mM, SDS 0.02%, pH 7.4) y se llevó a un volumen final de 1 mL. Para asegurarnos que se disolviera la agarosa y se desarmaran las cápsidas virales, la muestra se calentó a 90°C hasta que no quedo agarosa sólida y se dejó enfriar a temperatura ambiente. De esta muestra se tomaron 500  $\mu$ L y se llevaron a 1 mL con un amortiguador para cuantificación de DNA ( $Na_2HPO_4$  20 mM, SDS 0.02%, EtBr 40 mM, pH 7.4). La muestra se analizó en un espectrofluorómetro (ISS) con longitudes de onda de excitación y emisión de 520 y 600, respectivamente, a 20°C. Las longitudes de onda utilizadas nos permiten para detectar el complejo dsDNA/etidio. Estas lecturas se interpolaron en una curva patrón para cuantificar el DNA presente.

Las mismas muestras se utilizaron para determinar la concentración de proteína mediante el método de ácido bicinónico (BCA) contra una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA). Las muestras se incubaron por 30 min a 37°C y se leyeron a 562 nm. Con los datos de concentración de DNA y proteína se calculó la relación de estos componentes en las muestras extraídas del gel.



### 7.38 Purificación de VLP con DNA mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC)

Las VLP se ensamblaron junto al DNA mediante diálisis por 40 h en el amortiguador con base en KCl. El dsDNA utilizado fue obtenido de dos primers complementarios de 25 bases cada uno. La concentración final de proteína en cada ensamble fue de 0.5 mg/mL y la del DNA fue de 0.55 nmoles/mL. Una vez ensambladas las partículas, se les adicionaron 250 U de DNasa a la mitad de estas muestras, en este caso se usó Benzonasa<sup>®</sup> nucleasa (Sigma-Aldrich), y se puso a incubar durante 3 h a 30°C. Posteriormente, las muestras fueron filtradas, utilizando un filtro de 0.22 micrómetros para poderlas inyectar en el cromatógrafo.

Para poder asegurarnos que únicamente nos quedáramos con las VLP después de la digestión con DNasa, se utilizó un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (Waters). El equipo se ocupó con una columna preempacada HiLoad-Superdex 200 (16/600), la cual se equilibró con un amortiguador PBS<sub>2X arg</sub> (274 mM NaCl, 5.4 mM KCL, 4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 200 mM L-Arg, pH 7.4). Debido a que el equipo cuenta con un detector UV-Vis dual, se programó para detectar dos longitudes de onda distintas (260 y 280 nm) que nos permitieran seguir tanto a la proteína como al DNA. Las muestras se inyectaron en el equipo a un flujo constante de 0.8 mL/min y en el minuto 50 se empezó a coleccionar fracciones de 3.2 mL cada una. Las fracciones obtenidas fueron analizadas mediante DLS para encontrar aquellas que tuvieran los tamaños correspondientes a nuestras VLP. Para la cuantificación del DNA, solo se consideraron las fracciones que presentaron tamaños de 20 a 24 nm.

### 7.39 Análisis de las VLP y su DNA mediante espectrofluorometría

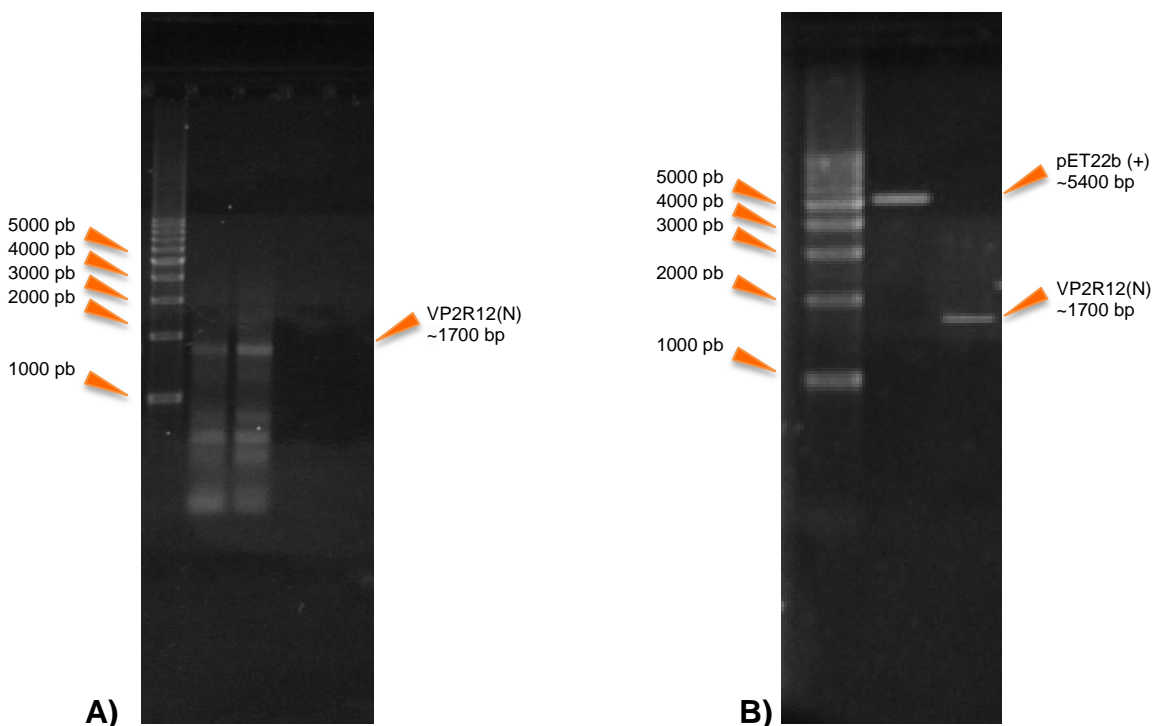
Para cuantificar el DNA encapsulado en las VLP se utilizó un espectrofluorómetro de la marca ISS. Debido a que la proteína podría causar interferencia en las mediciones del equipo, se utilizó bromuro de etidio para la cuantificación del DNA. El valor de excitación del complejo bromuro de etidio-DNA se fijó a 520 nm y se realizó un análisis de emisión en un rango de 550 a 750 nm. Para poder analizar correctamente las muestras, se encontró que se debía utilizar SDS al 0.02 % para asegurar que todas las VLP fueran desensambladas. Debido a lo anterior, para leer las muestras se utilizó un amortiguador para cuantificación de DNA (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, SDS 0.02%, EtBr 40 µM), del cual se ocupó 900 µL más 100 µL de muestra. Todas las muestras fueron analizadas a temperatura ambiente. Para poder cuantificar el DNA de las muestras de interés, se realizó previamente una curva patrón de DNA disuelto en el mismo amortiguador donde teníamos a nuestras VLP. Para cuantificar la proteína de las muestras, se utilizó un espectrofotómetro (Varian).

Para esto se utilizó otro amortiguador ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20 mM, SDS 0.02%), del cual se ocupó 900  $\mu\text{L}$  más 100  $\mu\text{L}$  de muestra.

## 8. Resultados

### 8.1 Diseño y construcción de la proteína quimérica VP2R12(N)

Para construir el gen que codifica para la proteína VP2R12(N) se extrajo y purificó el vector de clonación pET-22b(+) con el gen de la proteína VP2, con el cual ya se contaba en el laboratorio (Sánchez-Rodríguez et al., 2012). Este DNA plasmídico se utilizó como molde para realizar las 3 reacciones de PCR, a través de las cuales se fue adicionando la secuencia del péptido R12. En la Figura 8A se puede observar el producto obtenido del tercer PCR, el cual tienen un tamaño muy similar al gen original de VP2. Esto se debe a que se le cortaron 60 nucleótidos del extremo N-terminal, pero se le agregaron 42 mediante los 3 PCR. En la figura 8B se muestran tanto el vector como el inserto ya digeridos y purificados, en este caso ambos fragmentos tuvieron los tamaños esperados (~5400 bp y ~1700 bp respectivamente).



**Figura 8.** A) Análisis del producto obtenido del PCR 3. Carriles de izquierda a derecha: Marcador de tamaño, producto final del PCR 3. B) Vector pET-22b(+) e inserto (producto final del PCR 3) purificados después de la digestión. Carriles de izquierda a derecha: Marcador de tamaño, vector pET-22b(+), gen VP2R12(N).

Una vez que se ligó el inserto en el vector y se obtuvieron células transformantes de *E. coli* DH5 $\alpha$ , se les extrajo el DNA plasmídico y se mandó a secuenciar para confirmar que el gen con la que se iba a trabajar no presentaba ninguna mutación en su secuencia. La secuenciación se hizo utilizando el cebador universal para el promotor T7. Esta secuenciación mostró que no se había amplificado correctamente el gen y debido a varias complicaciones posteriores, relacionadas a una amplificación inespecífica en el PCR, se decidió mandar a sintetizar el gen VP2R12(N).

## 8.2 Pruebas de sobreexpresión de la proteína VP2R12(N)

El gen de la proteína VP2R12(N) se transformó en tres cepas diferentes de *E. coli* (BL21 (DE3), BL21 pLys, BL21 Gold) con el objetivo de identificar la mejor expresión. Se probaron distintas temperaturas, distintos tiempos de inducción (24 h fue para las temperaturas de 15 y 10°C) y diferentes concentraciones de IPTG como se indica en la tabla 2. Desafortunadamente, en ninguna de las condiciones se logró detectar la sobreexpresión de la proteína.

En este punto, consideramos la posibilidad de que la afinidad del péptido por el DNA/RNA bacteriano fuera demasiado alta. Esto último podría estar causando que, al producir la proteína, resulte toxica para la célula o incluso, que interfiera con su propio proceso de traducción, afectando su producción en la célula.

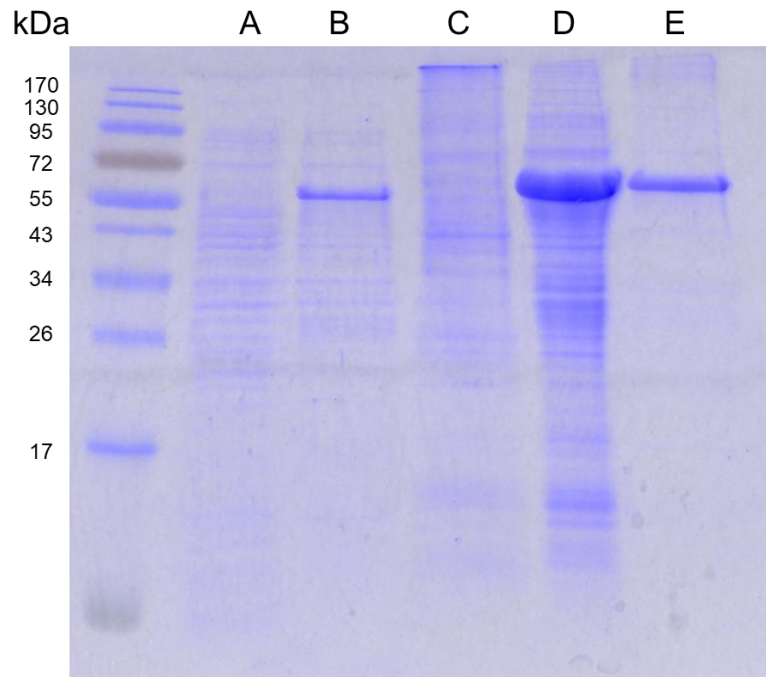
**Tabla 2.** Condiciones probadas para la sobreexpresión de la proteína VP2R12(N).

Cepa	Temperatura de inducción (°C)	Agitación (rpm)	Volumen (mL)	[IPTG] ( $\mu$ M)	Tiempo de inducción (h)	Sobre expresión
BL21	37, 30, 24, 15, 10	200	10	200 y 400	12 y 24	No se dio en ninguna condición
BL21 pLys	37, 30, 24, 15, 10	200	10	200 y 400	12 y 24	No se dio en ninguna condición
BL21 Gold	37, 30, 24, 15, 10	200	10	200 y 400	12 y 24	No se dio en ninguna condición

## 8.3 Pruebas de sobreexpresión y purificación de la proteína VP2R12(C)

Al mismo tiempo, se trabajó con la proteína VP2R12(C), para la cual se mandó a sintetizar el gen. Si bien ésta logró ser sobre-expresada (Figura 9, carril D), el proceso de obtención fue un tanto complicado, debido a que las condiciones de inducción fueron diferentes a las reportadas previamente en otros trabajos (Bustos-Jaimes et al., 2017; Sánchez-Rodríguez et al., 2012; Santillán-Uribe et al., 2015). Los dos factores determinantes para su sobre-expresión fueron el volumen del

medio de cultivo, el cual solo podía ser como máximo de 100 mL en un matraz de 200 mL, y la oxigenación, que fue reducida al disminuir la agitación orbital al momento de la sobre-expresión.



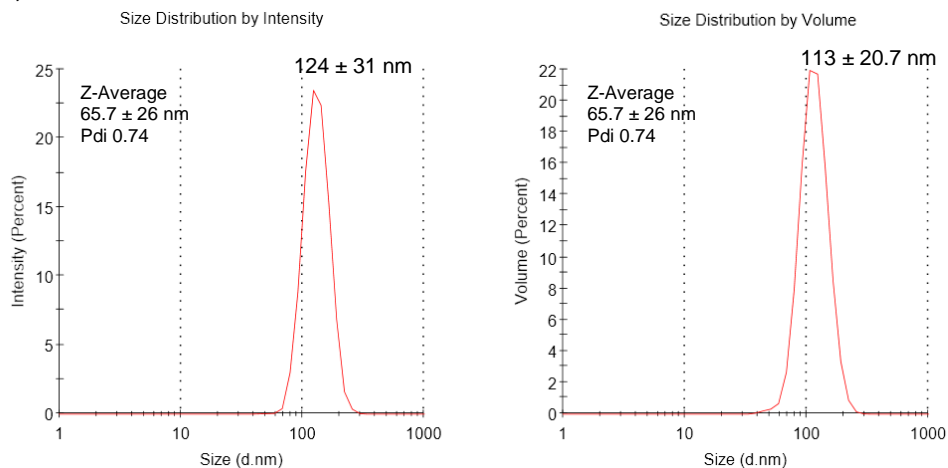
**Figura 9.** Análisis de la sobreexpresión y purificación de la proteína VP2R12(C). De izquierda a derecha: Primer carril marcador de peso molecular, carril A células antes de la inducción, carril B células después de la inducción, carril C fracción soluble después de la inducción, carril D cuerpos de inclusión solubilizados y carril e VP2R12(C) purificada.

Una vez que se logró sobreexpresar y se obtuvieron los cuerpos de inclusión, para poder recuperar la proteína se utilizó un protocolo diferente al que utilizamos para la proteína VP2. Esto fue debido a que, como se detalla más adelante, se descubrió que los cuerpos de inclusión retienen ácidos nucleicos, por lo cual tienen que ser disociados utilizando una solución con mayor fuerza iónica (1 M NaCl). Debido a complicaciones al dializar la proteína para ensamblar las VLP, se probaron distintos amortiguadores de ensamblaje. Se encontró que al aumentar la fuerza iónica en el amortiguador de diálisis, se obtenía una población del tamaño reportado para las VLP del parvovirus. A partir de lo anterior, se decidió lavar los cuerpos de inclusión con una solución 1 M de NaCl, como se menciona en la metodología. Al analizar esta solución mediante UV-Vis (260 nm), se detectó un espectro de absorbancia característico de DNA, por lo que se decidió agregar dos lavados más, con los que disminuyó considerablemente la cantidad de DNA detectable en la solución de lavado. A pesar de estas complicaciones, una vez solubilizada la proteína se purificó de manera eficiente y no presentó muchas impurezas, como otras quimeras de VP2 con las que se trabaja en el laboratorio (Figura 9, carril E).

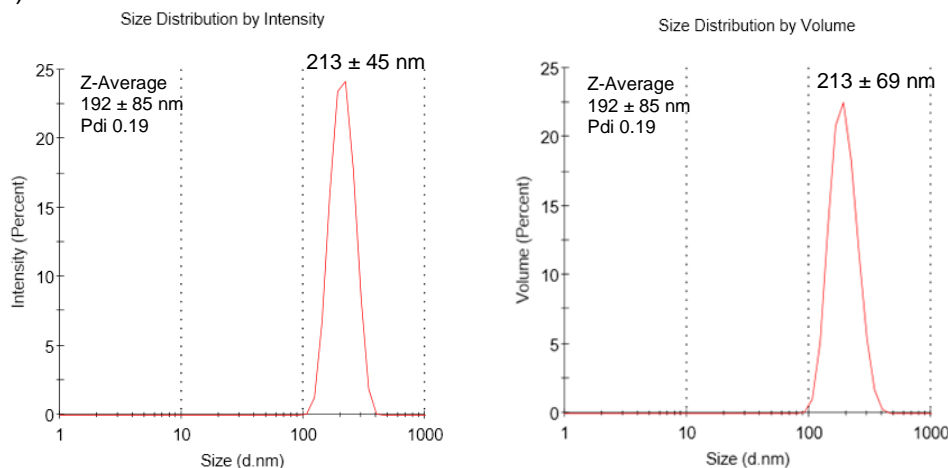
## 8.4 Pruebas de ensamble y caracterización de VLP con base en la proteína VP2R12(C) mediante DLS

Habiendo obtenido la proteína purificada, se procedió a ensamblarla en las condiciones ya establecidas previamente en nuestro grupo de trabajo. Sin embargo, como podemos observar en las figuras 10A y B, en estas condiciones se obtuvo una población monodispersa de partículas con un tamaño promedio de 113 nm, el cual es superior al tamaño reportado para esta VLP (20 nm). Lo interesante en este punto es que, si bien los tamaños de estas partículas eran demasiado grandes, parecía que se formaba un nuevo tipo de VLP, ya que la población es bastante homogénea (tanto por intensidad como por volumen) y difícilmente se podría tratar de agregados amorfos de proteínas o algún otro tipo de partícula, ya que estos suelen ser más polidispersos. No obstante, lo que se buscaba en este proyecto era mantener el tamaño reportado de las VLP del *Parvovirus B19*, con la capacidad de unir material genético de forma no selectiva. Por esta razón, se buscaron nuevas condiciones que permitieran obtener partículas con un menor tamaño.

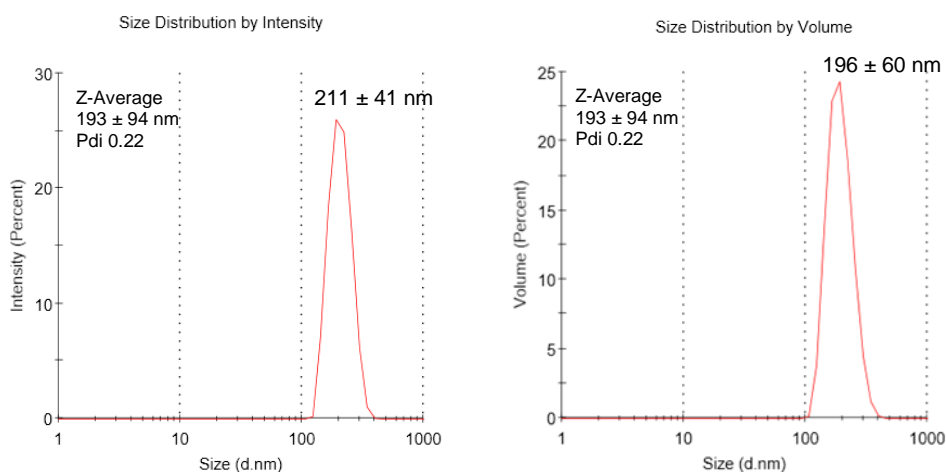
A)



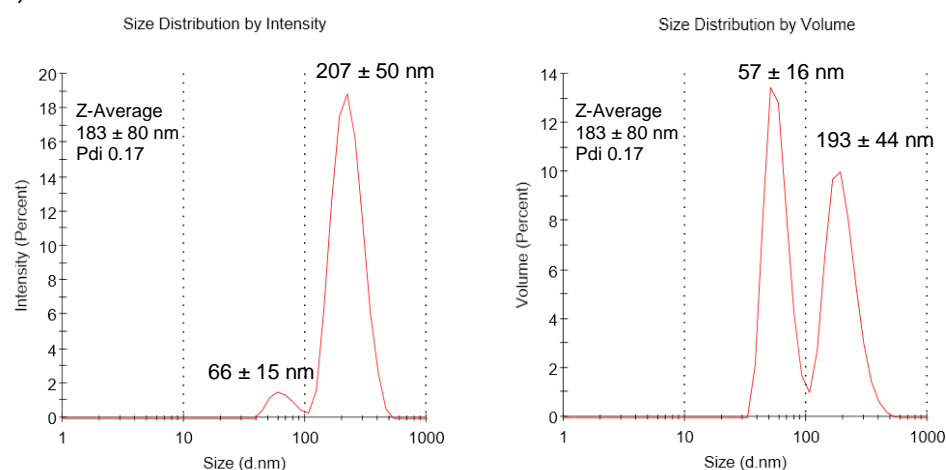
B)



C)



D)

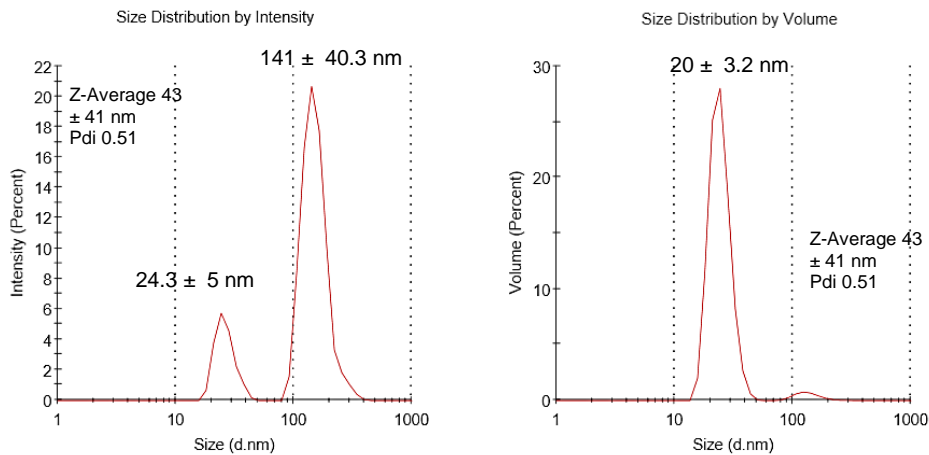


**Figura 10.** Distribución de tamaños por intensidad y volumen de las VLP (VP2R12(C)) obtenido mediante DLS. A) PBS<sub>Arg</sub>. B) PBS<sub>2X</sub>. C) 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mM NaCl, 200 mM L-Arg, pH 7. D) 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 400 mM NaCl, 200 mM L-Arg, pH 7. Los gráficos mostrados son un promedio de 10 mediciones

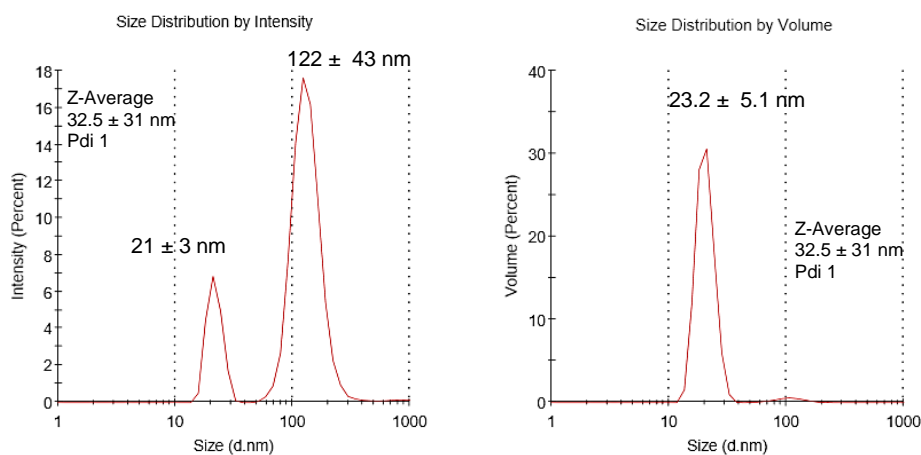
Como era probable que las cargas extra de los ARM fueran las responsables de este nuevo arreglo en las VLP, se buscó neutralizarlas para ver si obteníamos resultados diferentes. La primera estrategia fue aumentar la concentración de fosfatos en la solución de replegamiento, ya que estos, en comparación a otras sales, deberían tener una mayor afinidad por los grupos guanidinio de las argininas en los ARM. Pero, como podemos observar en la figura 10B, al duplicar la concentración de fosfatos en el amortiguador PBS<sub>2X</sub>, las partículas crecieron aún más, por lo que se descartó esta idea. La siguiente estrategia fue aumentar la fuerza iónica del medio para generar un efecto de apantallamiento sobre las cargas de los ARM, lo cual ya ha sido reportado previamente (Cadena-Nava et al., 2012; Garmann et al., 2014; Perlmutter & Hagan, 2015). En este punto se probaron dos amortiguadores de replegamiento distintos, uno con 200 mM de NaCl y otro con 400 mM de NaCl (Fig. 10C y 10D respectivamente). A partir de esto, se observó que con una mayor fuerza iónica, aparece una población de partículas de menor tamaño, pero este sigue siendo más grande que el reportado para estas VLP.

Con base en lo anterior, se fueron probando distintas concentraciones y tipos de sales para encontrar las condiciones que permitieran obtener partículas de un menor tamaño. De esta manera, se encontró que al usar un amortiguador de replegamiento con 1 M de NaCl, se obtenía una población mayoritaria de partículas con el tamaño esperado (entre 20 a 24 nm) (Fig. 11A). Sin embargo, estas condiciones eran muy distintas a las habituales, por lo que nos preguntamos si realmente estábamos obteniendo VLP y no otra cosa por efecto de la alta concentración de sales. Por esta razón, se probó ensamblar a la proteína VP2 bajo estas mismas condiciones para usarla como un control y ver su comportamiento (Anexos 1). Al analizar las partículas por DLS, se observó que también presentaron tamaños de entre 20 a 24 nm, lo que nos hizo pensar que probablemente, aún en estas condiciones, se pueden ensamblar VLP. Es importante mencionar que, en tales condiciones, sigue apareciendo por intensidad una población mayor a los 100 nm, que prácticamente desaparece en la distribución por volumen. Esto lo atribuimos a que, al transformar los valores de la distribución por intensidad en una distribución por volumen, la contribución de volumen del segundo pico es muy pequeña. Esto nos indica que en estas condiciones se favorece la formación de partículas con tamaños cercanos a 20 nm, mientras que se desfavorece la formación de partículas de más de 100 nm.

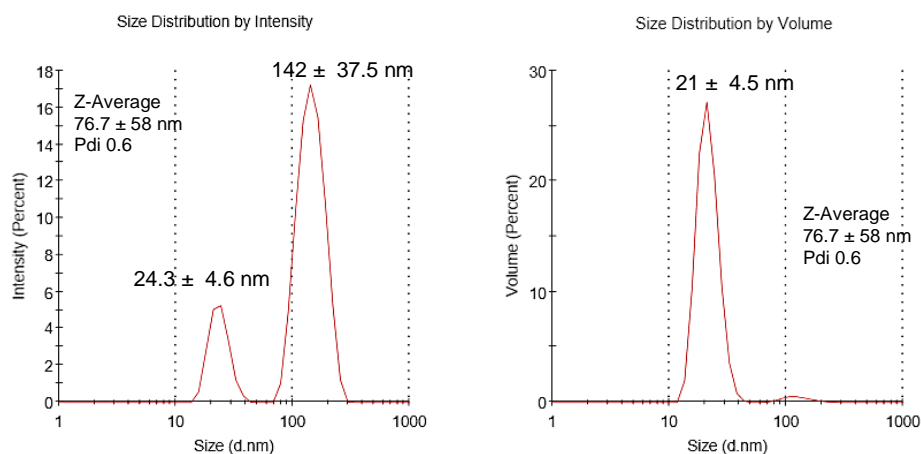
A)



B)



C)



D)

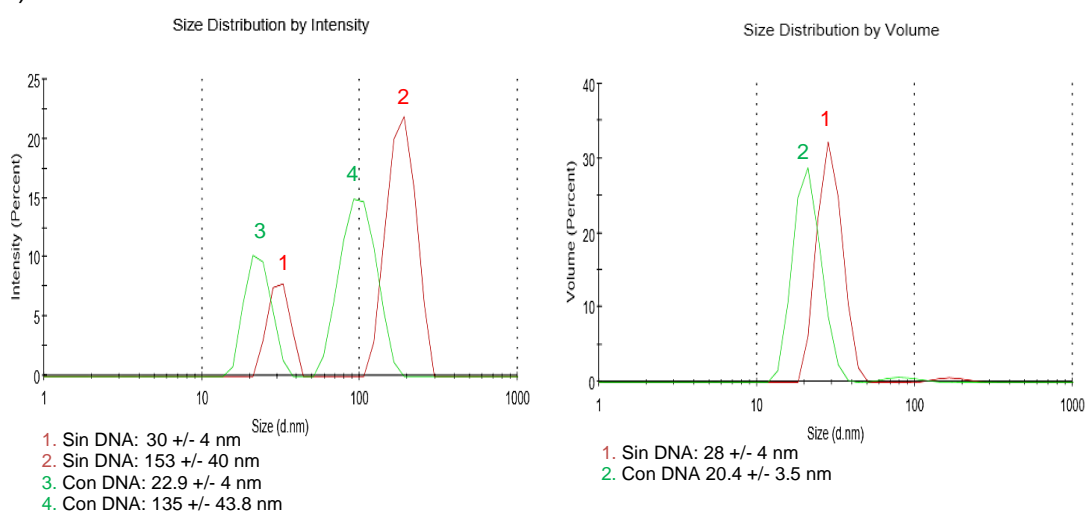


Figura 11. Distribución de tamaños por intensidad y volumen de las VLP de VP2R12(C) bajo distintas condiciones. A) Ensamble sin DNA dializado en una solución con 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1 M NaCl, 200 mM L-Arg pH 7.4. B) Ensamble con dsDNA (25 bp), dializado en la misma solución que el anterior. C) Coensamble (VP2 80% + VP2R12(C) 20%) dializado en  $\text{PBS}_{2\times}$ . D) Ensamble con y sin dsDNA (25 bp), dializado en 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 350 mM KCl, 200 mM L-Arg, pH 7.4. Sin DNA Z- Average 87 ± 78 nm, Pdi 0.8, con DNA Z- Average 13.8 nm, Pdi 1. Los gráficos mostrados son un promedio de 10 mediciones.

De igual forma, era importante saber si estas nuevas condiciones no afectarían la interacción del péptido R12 con el DNA, por lo que se probó ensamblar a la proteína junto con DNA (25 bp) bajo estas condiciones. Con esto se observó, al menos por el DLS, que las poblaciones de partículas se volvían más polidispersas, aunque no variaban tanto de tamaño (Fig. 11B). A pesar de esto, el resultado no fue concluyente, y no pudimos asegurar que estas condiciones fueran las óptimas para la unión de los ácidos nucleicos con las proteínas y su ensamble. Por esta razón, se probó como una alternativa, coensamblar a las proteínas VP2 y VP2R12(C) en diferentes proporciones, hasta encontrar una en donde ensamblaran correctamente con una menor fuerza iónica (Anexo 2). Fue con un 80% de VP2 en el coensamble donde se logró obtener una población de partículas más homogénea y con el

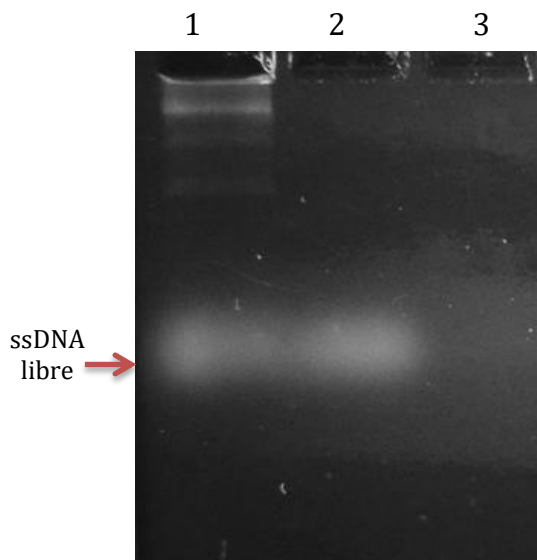


tamaño esperado (Fig. 11C). El problema de esto fue que al utilizar un porcentaje tan elevado de la proteína VP2, cuyo tamaño es prácticamente el mismo que la proteína VP2R12, no se podía comprobar que realmente ambas proteínas habían coensamblado, ya que existe la posibilidad de que lo observado por el DLS fuera una población mayoritaria de VLP compuesta únicamente por la proteína VP2.

Además de las condiciones ya encontradas, se siguieron probando otras, para encontrar una que permitiera usar una menor concentración de sales para el ensamble. Fue así que se llegó, después de un tiempo, a una solución de replegamiento que también permite obtener una población mayoritaria de VLP con el tamaño deseado, pero usando una menor fuerza iónica. En esta nueva solución (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 350 mM KCl, 200 mM L-Arg, pH 7.4), se comparó el ensamble de la proteína VP2R12(C) con DNA y sin DNA (Fig. 11 D). En ambos casos se obtuvo una población mayoritaria con un tamaño cercano a los 20 nm, la única diferencia fue que en el ensamble con DNA, las VLP tuvieron un tamaño promedio superior a las que se ensamblaron sin DNA. No obstante, consideramos que esta era una mejor condición que las anteriores, debido a que producía partículas de un tamaño muy cercano al esperado y al tener una menor concentración de sales, no afectaría las interacciones DNA-proteína.

## **8.5 Ensayos del cambio en la movilidad electroforética (EMSA)**

Con la finalidad de comprobar las propiedades de unión a ácidos nucleicos de la proteína VP2R12(C), se caracterizó el cambio en la movilidad electroforética del DNA al estar en interacción con esta proteína. Para saber si realmente había una diferencia significativa en la interacción de este nuevo péptido con el DNA, se ensambló un lote de VLP con la proteína VP2R12(C) y otro con VP2, a los cuales se les adicionó ssDNA previo al ensamble. En la Figura 12 (carril1) se pueden observar varias bandas, la banda difusa en la parte inferior del gel corresponde a ssDNA libre, mientras que las bandas superiores corresponden ssDNA en interacción con la proteína VP2R12(C), la que reduce su movilidad electroforética. Lo anterior confirma que la proteína tuvo la capacidad de unirse al DNA. Por otro lado, también pudimos observar que las VLP de VP2 no tienen la misma capacidad de unión a DNA que la proteína VP2R12(C), ya que aquí no se observó ningún cambio en la movilidad del DNA (Fig. 12, carril 2). Como control negativo se incluyó a las VLP de la proteína VP2R12(C) sin DNA, lo cual mostró que, por sí solas, estas VLP no generan ninguna señal (Fig. 12, carril 3) al no tener un DNA con el que interactuar.



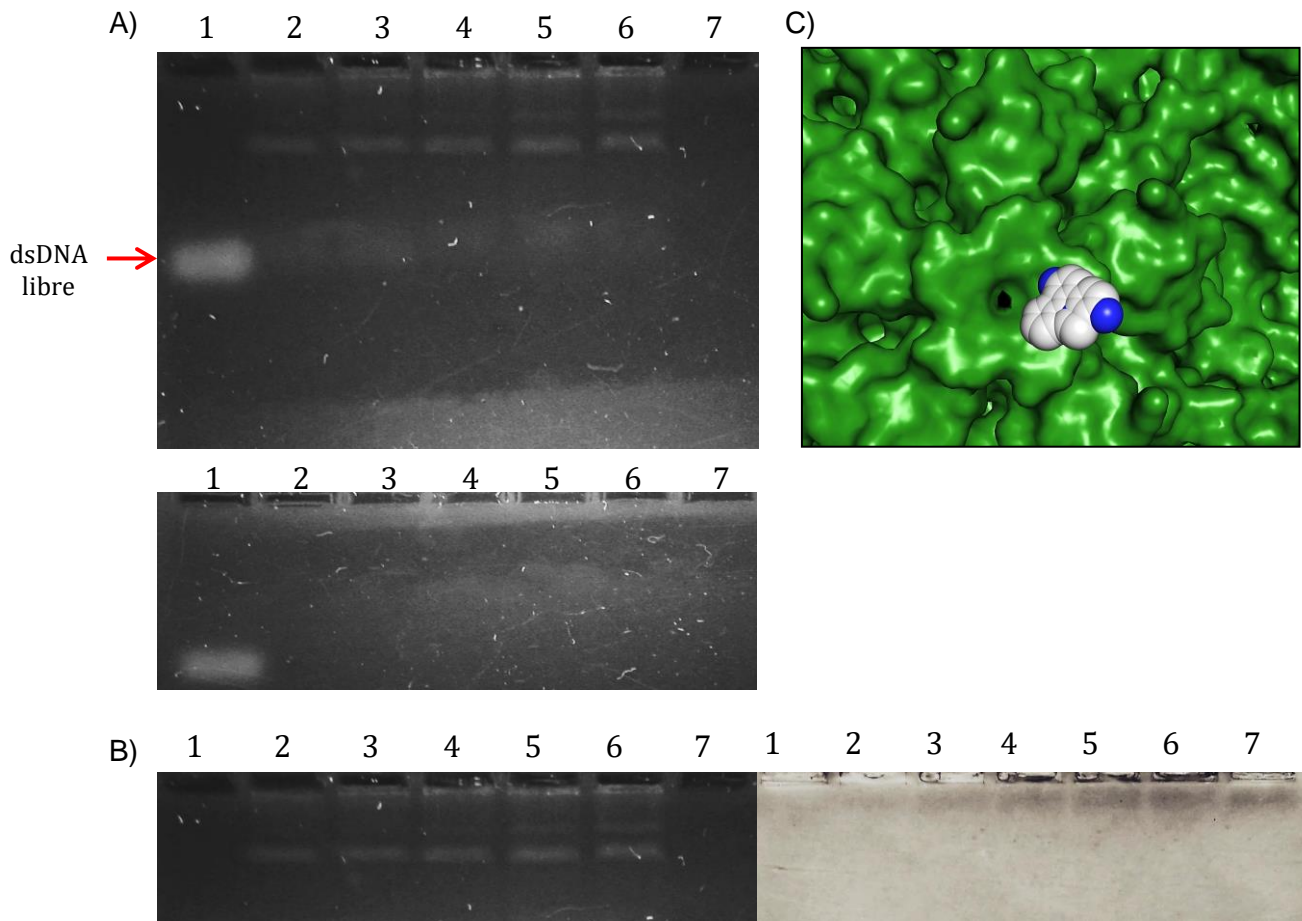
**Figura 12.** EMSA para comprobar la interacción de la proteína VP2R12(C) con ssDNA (50 nt). Carril 1, VLP de VP2R12(C) con ssDNA; carril 2, VLP de VP2 con ssDNA; carril 3, VLP de VP2R12(C) sin ssDNA. Ensamblados realizados en amortiguador de fosfatos 20 mM, 350 mM KCl, pH 7.4

Es importante mencionar que, en este ensamble, la relación molar proteína VP2R12(C)/ DNA fue de 10/1. En el gel se observó que, aun cuando la proteína está en exceso, todavía queda ssDNA no encapsulado. Esto puede deberse a que al usar un DNA de cadena sencilla y de un tamaño pequeño, este no tiene regiones de hibridación en su estructura que le permitan formar una doble cadena. Por lo que el péptido R12, al estar diseñado para unir DNA de doble cadena, tendría una menor afinidad por este ácido nucleico.

Debido a que el péptido R12 está diseñado para unir DNA de cadena doble, se realizó un EMSA para probar distintas relaciones molares de proteína VP2R12(C) / dsDNA. Con este experimento se buscó ver si había un cambio en la migración del DNA en función de las diferentes relaciones molares. Como podemos observar en la figura 13A, la migración fue muy similar, con la única diferencia de que a una mayor concentración de proteína se detectaron al menos 2 especies diferentes en el gel. Suponemos que las especies que tuvieron una mayor migración son intermediarios de cápsides no ensambladas (capsómeros o cápsides incompletas). Al probar la capacidad de protección de estas partículas contra DNAsas, se observó que en ninguna proporción se logra proteger el DNA (Fig. 13A), lo que nos hizo pensar que en estas condiciones no se estaban ensamblando correctamente las partículas.

Posteriormente, comparamos el perfil de migración de la interacción dsDNA/proteína teñido con bromuro de etidio y con azul de Coomassie, respectivamente (ambos geles se corrieron en la misma cámara, bajo las mismas condiciones). Esto mostró que la proteína y el DNA migraron de forma similar. Sin embargo, al analizar este resultado, se encontró que la porción mayoritaria de la proteína o cápsides quedó por encima de ambas bandas con DNA (Fig. 13B). Esto indica dos cosas, una es que la fracción mayoritaria de las cápsides tiene muy poca intensidad cuando se le tiñe con bromuro de etidio, y la otra es que las bandas detectadas por esta misma técnica, al estar en una región más abajo en el gel y al no poder proteger al DNA de

la benzonasa, se traten posiblemente de intermediarios no completos de las cápsides.

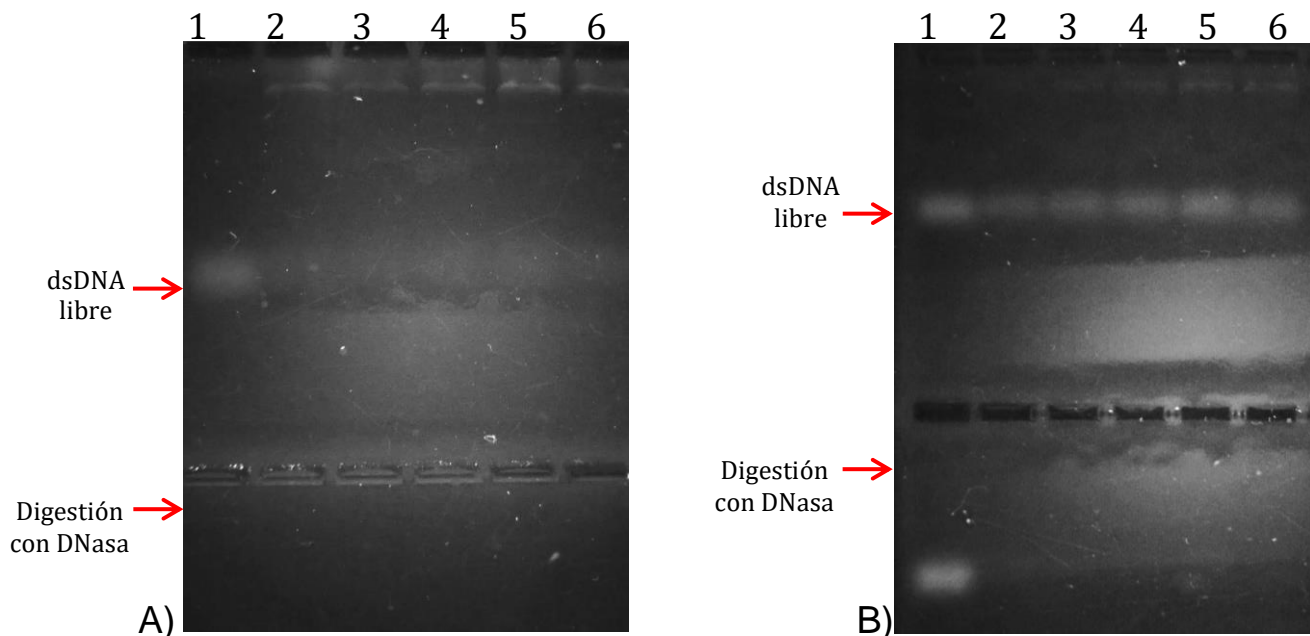


**Figura 13.** EMSA para encontrar la relación óptima entre proteína:dsDNA para el ensamble de VLP. A) Carril 1, DNA; carril 2, relación molar 3:1; carril 3, relación molar 4:1; carril 4, relación molar 6:1; carril 5, relación molar 10:1; carril 6, relación molar 15:1; carril 7, VLP sin DNA. En la imagen inferior son pruebas de digestión con la nucleasa benzonasa. B) Comparación del cambio en la movilidad electroforética al teñir para DNA o para proteínas los geles. Ensamblados realizados en amortiguador de fosfatos 20 mM, 350 mM KCl, pH 7.4. C) Modelo de una cápside del Parvovirus B19 donde se compara el tamaño del poro, en el eje de simetría de orden 5, contra una molécula de ion etidio.

Asumiendo que lo anterior era cierto, se analizó un modelo de la estructura de la cápside del Parvovirus B19 junto con una molécula de bromuro de etidio, y se encontró que esta última es demasiado grande como para atravesar el poro formado en el eje de simetría de orden 5 (Fig. 13C). En este caso, se calculó a través de Pymol las distancias de las moléculas mostradas en el modelo. Midiendo a partir del oxígeno y de la treonina 136 de un protómero de VP2 contra el mismo oxígeno del protómero de enfrente, el poro de la cápside tiene un diámetro de 5.2 Å. Por otra parte, el diámetro mínimo que tiene la molécula de bromuro de etidio es de 7.4 Å, midiendo del carbono 18 al carbono 9. Esto nos muestra que el diámetro de la molécula de bromuro de etidio es mayor al del poro de la VLP, además de que estos

valores no consideran el radio de Van der Waals de cada átomo mencionado, lo cual haría que la diferencia de diámetros fuera aun mayor. Por lo anterior, es muy probable que una parte de la fracción mayoritaria de proteína, sean cápsides ensambladas (dado que además tuvieron el perfil de migración más retrasado) que no permiten la entrada de bromuro de etidio y por lo tanto no muestran fluorescencia. Por último, también observamos que la proteína VP2R12 (C) sí tiene una mayor afinidad por el DNA de cadena doble, ya que este casi no se alcanzó a detectar de forma libre en el gel. En ambas condiciones se utilizó la misma concentración de DNA.

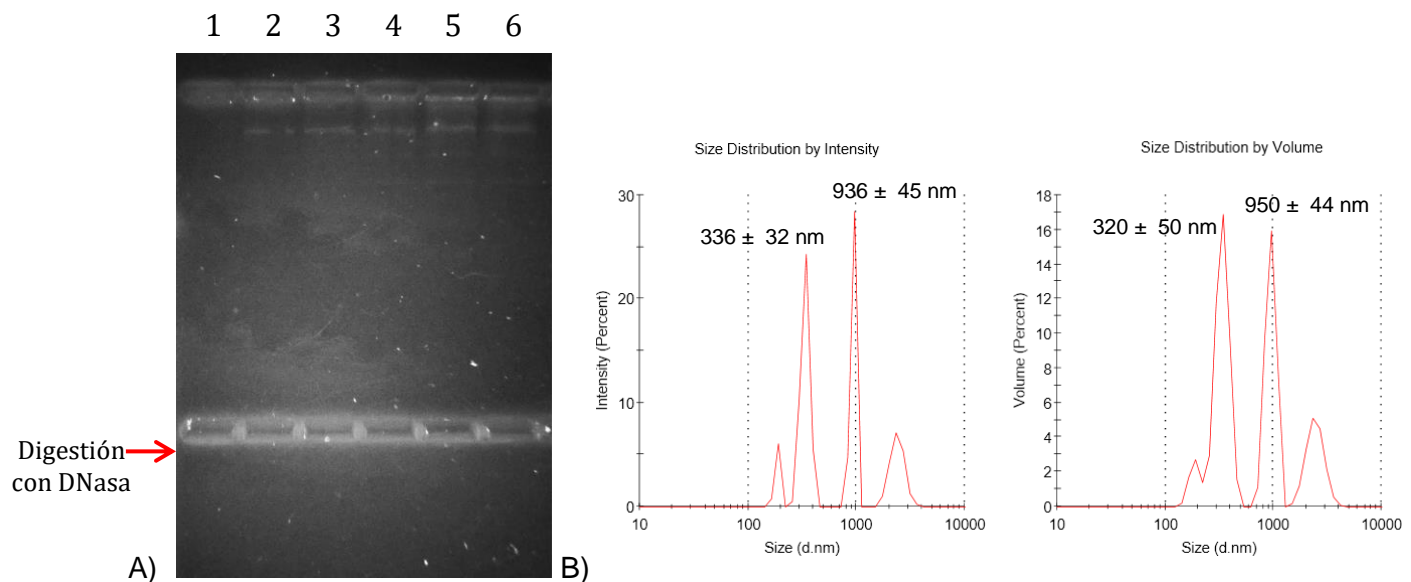
Para complementar lo anterior, también se probaron las condiciones de ensamble previamente encontradas (alta fuerza iónica o coensamble con la proteína VP2), bajo las mismas relaciones molares de proteína:DNA. Primero se probó la solución de mayor fuerza iónica, con la cual se habían obtenido las mejores condiciones de ensamblaje previamente. En el EMSA de estas muestras se pudo observar que aun en estas condiciones, la proteína VP2R12(C) es capaz de seguir uniendo dsDNA (Fig. 14A). La unión, como era de esperarse, tuvo una menor eficiencia. Esto se comprobó al poder observar que sí hubo DNA sin interactuar en el gel. En la misma figura A, en la parte de abajo, se realizó una prueba de protección contra DNasas donde se observó que en ninguna proporción se logra proteger al DNA.



**Figura 14.** EMSA de VLP bajo distintas condiciones de ensamble. A) VLP en base a VP2R12(C) ensambladas a mayor fuerza iónica, ensambles realizados en amortiguador de fosfatos 20 mM, 1 M NaCl, pH 7.4. B) VLP en coensamble VP2R12(C)-VP2, ensambles realizados en amortiguador de fosfatos 20 mM, 350 mM KCl, pH 7.4. En ambas figuras: carril 1, DNA; carril 2, relación molar 3:1; carril 3, relación molar 4:1; carril 4, relación molar 6:1; carril 5, relación molar 10:1; carril 6, relación molar 15:1.

Para comprobar que no fuera un problema de las VLP obtenidas únicamente con la proteína VP2R12(C), lo que impidiera obtener ensamblajes que protegieran al DNA, también se probaron coensambles utilizando la proteína VP2 en una proporción del 70%. En este experimento se observó que, debido a que hay una menor proporción de la proteína VP2R12(C), las bandas de interacción proteína:DNA son más tenues y se observó más DNA libre en todos los carriles (Fig. 14B). En la misma figura, en la parte de abajo, nuevamente se realizó una prueba de protección contra DNasa donde se observó que en ninguna proporción se logra proteger el DNA. Lo anterior nos hace pensar que quizás las cápsidas si están ensambladas correctamente, pero al igual que en el modelo, es posible que el bromuro no esté entrando en éstas y no pueda emitir una señal. Por lo tanto, era necesario utilizar una estrategia diferente para comprobar esta suposición.

Además de intentar formar partículas icosaédricas, aprovechamos la capacidad que tiene esta proteína para unirla a un DNA de mayor tamaño (vector pGEM linealizado), con el cual esperábamos que se formara una estructura tipo helicoidal. Las partículas obtenidas se analizaron por EMSA para ver si había un cambio en su migración en comparación con las partículas icosaédricas. Como podemos observar en la figura 15A, el perfil de migración fue muy similar a los observados previamente, con la única diferencia de que hubo un mayor avance de las bandas (lo cual era de esperarse por el mayor tamaño del DNA).



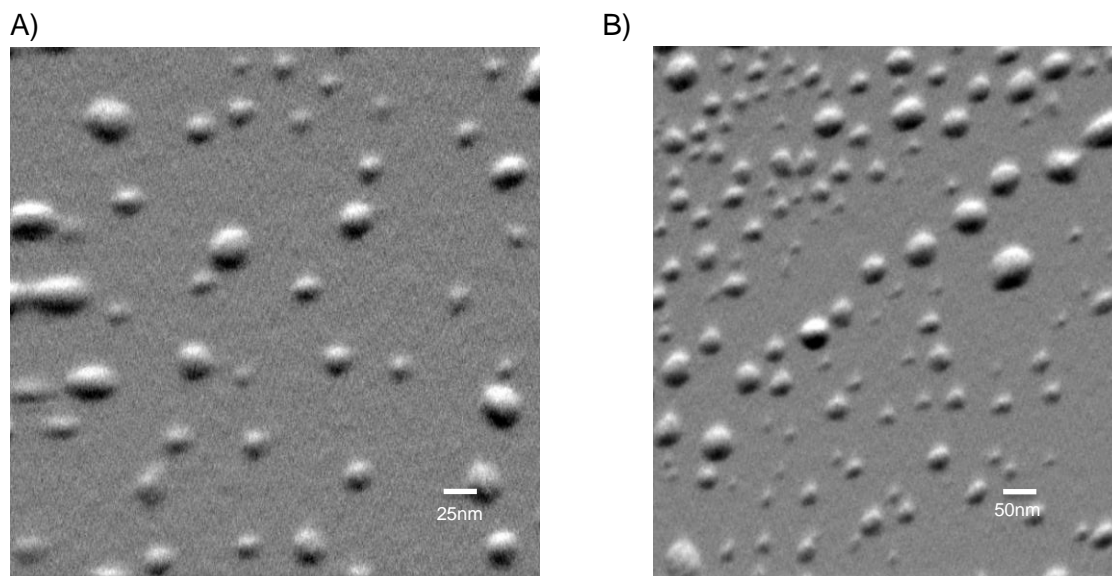
**Figura 15.** EMSA de VP2R12(C) unido a dsDNA de 3 kb. A) Interacción realizada en amortiguador de fosfatos 20 mM, 1 M NaCl, pH 7. Carril 1, DNA; carril 2, relación molar 3:1; carril 3, relación molar 4:1; carril 4, relación molar 6:1; carril 5, relación molar 10:1; carril 6, relación molar 15:1. B) Distribución de tamaños por interacción y volumen. Z-Average  $1386 \pm 1359$  nm, Pdi 0.96.

En la misma figura, en la parte inferior, también se realizó una prueba de protección contra DNasa. En ésta se observó que en ninguna proporción se logró proteger el DNA. Lo anterior nos hace pensar que es posible que la proteína no recubra de

manera eficiente todo el DNA, esto puede deberse a que entre ellas se estorben y dejen espacios pequeños donde la DNasa pueda entrar a cortar. También se analizó el tamaño obtenido de estas partículas por DLS (Fig. 15B), aquí aparecieron 3 especies de tamaños distintos. No obstante, sería necesario analizar estas partículas por otra técnica para determinar el tamaño correspondiente a la interacción.

## 8.6 Análisis por microscopía de fuerza atómica (AFM) de VLP VP2R12(C)

Para tener una mejor idea de lo que estaba sucediendo con el ensamble de las VLP formadas por la proteína VP2R12(C), se analizaron las partículas por AFM. Se pudo observar que existen distintas poblaciones de partículas (Fig. 16). En el campo analizado, hay una población de VLP con un tamaño de 20 a 25 nm, pero también hay partículas de mayor tamaño (40 a 60 nm). Estas últimas son interesantes porque también parecieran tener forma esférica o icosaédrica, lo cual podría indicar que VP2R12(C) puede ensamblarse en otras estructuras supramoleculares icosaédricas de mayor tamaño.

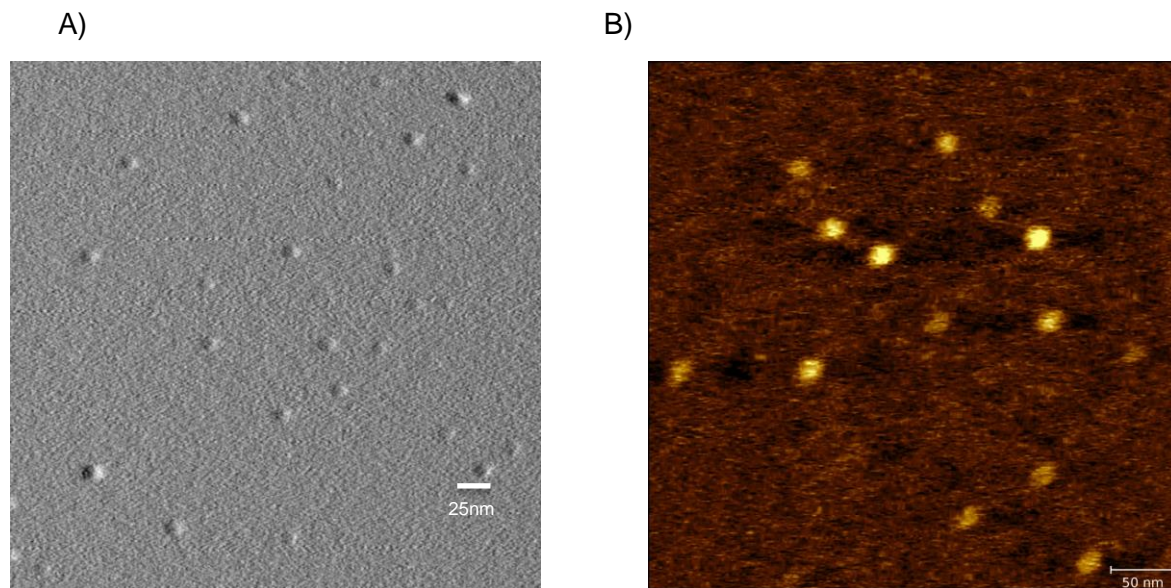


**Figura 16.** AFM de VLP VP2R12(C) + dsDNA (25 bp). A) Región 1 - microscopía analizada por amplitud (tapping) B) Región 2 - microscopía analizada por amplitud (tapping). Muestras dializadas en amortiguador con 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 350 mM KCl, 200 mM L-Arg, pH 7.4.

De igual forma, se analizaron las VLP del coensamble para compararlas con las de VP2R12(C) 100%. En esta muestra se observó una población bastante homogénea de partículas, las cuales tenían en promedio 24 nm de diámetro (Fig. 17). A diferencia de las VLP de VP2R12(C) 100%, aquí no hubo especies de mayor tamaño. Lo que llama la atención de ambos resultados es que se obtuvieron partículas completas, por lo que es probable que la fracción mayoritaria de la



proteína observada en los EMSA sean cápsides virales. Esto sigue haciendo viable la idea de que el bromuro de etidio no logró entrar en las cápsides y por eso no observamos una señal.



**Figura 17.** AFM de VLP del coensamble (VP2 70% VP2R12 30%) + dsDNA (25 bp). A) Región 1 - microscopia analizada por amplitud (tapping) B) Región 2 - microscopia analizada por altura. Muestras dializadas en amortiguador con 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 350 mM KCl, 200 mM L-Arg, pH 7.4

## 8.7 Cuantificación por espectrofluorimetría del DNA encapsulado en las VLP de VP2R12(C) obtenidas por EMSA

Para analizar la fracción mayoritaria de proteína/VLP observada en los EMSA y comprobar que realmente contenía DNA, esta fue aislada del gel de agarosa, abarcando solo la fracción mayoritaria de proteína. La banda se disolvió en un amortiguador con SDS al 0.02%, para asegurarnos que se desarmaran las cápsides virales, y se analizó en un espectrofluorómetro para detectar y cuantificar el DNA que pudiera contener. Con esto se descubrió que, a pesar de que no se podía detectar una señal con el bromuro de etidio en el gel de agarosa, la fracción mayoritaria de proteína sí contenía DNA (Tablas 3, 4, 6 y 7). Como blanco se utilizó un fragmento del mismo gel de agarosa (una región lejana a las muestras), disuelto en el mismo amortiguador. Posteriormente, a través de una curva patrón se pudo cuantificar la concentración de DNA que había en la banda cortada y esta a su vez, se comparó contra la concentración de proteína en la misma muestra.

**Tabla 3.** Curva patrón y determinación de la concentración del DNA obtenido por banda de gel de VLP en una relación 5-1

Curva patrón [DNA] pmol/mL	Intensidad	IntensidadStderror	-
0	40085.0	303.9	-
30	50084.8	309.2	-
60	58895.2	331.9	-
90	65199.2	226.3	-
120	71295.2	444.9	-
Muestras	Intensidad	IntensidadStderror	[DNA] pmol/mL
VP2 + DNA	44120.4	251.3	29.56
VP2R12 + DNA	47245.2	215.6	52.44
VP2R12 + DNA + DNasa	42483.6	242.3	17.56

Valores utilizados para la medición en el espectrofluorómetro: excitación  $\lambda = 520$  nm, emisión  $\lambda = 600$ , temperatura 20° C. El experimento se hizo por duplicado y el dato mostrado en la tabla es el promedio.

**Tabla 4.** Curva patrón para la cuantificación por BCA de proteína de VLP en una relación 5-1.

[Albumina] $\mu\text{g}$	Absorbancia	-
0	-	-
20	0.46	-
40	0.91	-
60	1.34	-
80	1.7	-
Muestras	Absorbancia	[ $\mu\text{g}$ ]
VP2	0.05	1.122
VP2R12	0.034	0.373
VP2R12 + DNasa	0.03	0.187

Temperatura de incubación de las muestras: 37° C por 30 min. Abs. 562 nm. 1 mL total de cada muestra

**Tabla 5.** Relación molar DNA/proteína obtenida por banda de gel de VLP en una relación 5-1

	[Proteína] $\mu\text{g/mL}$	[Proteína total] nM	[DNA total] nM	DNA total/ proteína total
VP2	11.22	180.88	29.56	0.163
VP2R12	3.73	60.29	52.44	0.869
VP2R12 + DNasa	1.87	30.15	17.56	0.582

Las concentraciones de DNA que se presentan en la tabla fueron obtenidas a través de una curva patrón, al multiplicarlas por su factor de dilución (x2). Las concentraciones de proteína que se presentan en la tabla fueron obtenidas a través de una curva patrón de BSA al multiplicarlas por su factor de dilución (x10).

En las tablas 5 y 8 se muestra la relación de DNA/proteína obtenida en cada banda cortada. Para los ensambles utilizados, se probaron dos relaciones molares diferentes de proteína-dsDNA, una relación fue 5-1 y la otra fue 2-1. En la relación 5-1 se utilizó una concentración de DNA de 150 picomoles y para la relación 2-1 fue de 350 picomoles. En total fueron cortadas 3 bandas por cada relación molar, las cuales



contenían VLP de VP2, VP2R12(C), y VP2R12(C) en interacción con benzonasa, respectivamente. La benzonasa se adicionó (250 U) a las VLP ya ensambladas y se incubó por 30 min a 30°C.

**Tabla 6.** Curva patrón y determinación de la concentración del DNA obtenido por banda de gel de VLP en una relación 2-1

Curva patrón [DNA] pmol/mL	Intensidad	IntensidadStderror	-
0	35716.8	230.1	-
30	43253.6	299.5	-
60	51509.6	290.4	-
90	57660.0	428.8	-
120	67976.1	236.7	-
150	76203.2	429.9	-
Muestras	Intensidad	IntensidadStderror	[DNA] pmol/mL
VP2 + DNA	40958.4	303.4	42.00
VP2R12 + DNA	41975.2	302.5	49.55
VP2R12 + DNA + DNasa	39778.8	351.6	33.26

Valores utilizados para la medición en el espectrofluorómetro: excitación  $\lambda = 520$  nm, emisión  $\lambda = 600$ , temperatura 20° C. El experimento se hizo por duplicado y el dato mostrado en la tabla es el promedio.

**Tabla 7.** Curva patrón para la cuantificación por BCA de proteína de VLP en una relación 2-1.

[Albumina] $\mu$ g	Absorbancia	-
0	-	-
20	0.52	-
40	1	-
60	1.45	-
80	1.9	-
Muestras	Absorbancia	[ $\mu$ g]
VP2	0.035	0.295
VP2R12	0.035	0.295
VP2R12 + DNasa	0.034	0.253

Temperatura de incubación de las muestras: 37° C por 30 min. Abs. 562 nm. 1 mL total de cada muestra

**Tabla 8.** Relación molar DNA/proteína obtenida por banda de gel de VLP en una relación 2-1.

	[Proteína] $\mu$ g/mL	[Proteína total] nM	[DNA total] nM	DNA total/proteína total
VP2	2.953	47.64	42.0	0.881
VP2R12(C)	2.953	47.64	49.5	1.040
VP2R12(C)+ DNasa	2.532	40.83	33.3	0.815

Las concentraciones de DNA que se presentan en la tabla fueron obtenidas a través de una curva patrón, al multiplicarlas por su factor de dilución (x2). Las concentraciones de proteína que se

presentan en la tabla fueron obtenidas a través de una curva patrón de BSA al multiplicarlas por su factor de dilución (x10).

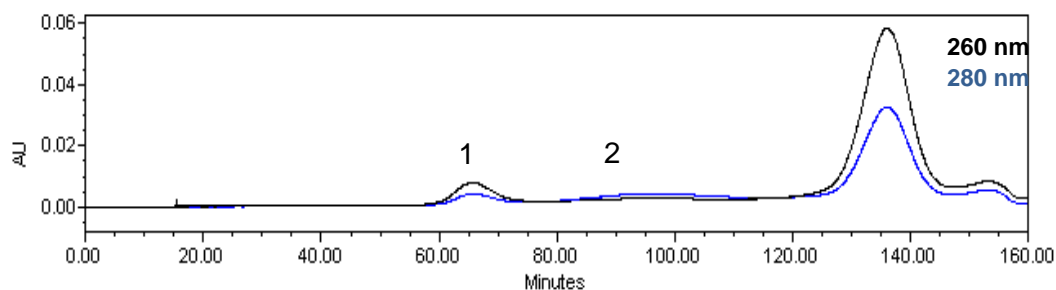
Lo más relevante que pudimos encontrar mediante estos experimentos fue la cantidad de DNA que encapsulaban los distintos tipos de VLP (dependiendo de la proteína), ya que se observó que a una relación molar 5:1, la eficiencia de encapsulamiento de la proteína VP2R12(C) era superior a la de VP2. No obstante, en una relación 2:1, donde hay una mayor concentración de DNA, pareciera que se alcanza una saturación de encapsulamiento en ambas proteínas. Aun así, es importante aclarar que, debido al tamaño pequeño de los fragmentos de DNA, estos fácilmente se pueden encapsular de forma aleatoria al momento del ensamblaje de cualquier VLP, pero cuando su concentración es limitada se ve una clara diferencia entre la capacidad de unión de la nueva proteína y la de VP2. También es probable que la relación DNA/proteína hubiera sido diferente si en lugar de probar con fragmentos pequeños, se hubiera utilizado ssDNA de un mayor tamaño, ya que como se menciona previamente, se sabe que la longitud termodinámica óptima y la relación de cargas (sobrecarga negativa) son fundamentales para el máximo rendimiento de encapsulamiento y el correcto ensamblaje de una cápside viral.

Finalmente, otro punto importante que se observó con estos experimentos fue que las cápsides protegieron al DNA de la acción de las DNAsas. Claramente la relación DNA/proteína es menor, lo que sugiere que un porcentaje de cápsides no están ensambladas correctamente, pero aun así existe una población que si lo está y que protegen el DNA. De igual manera que lo anterior, es probable que la proporción de cápsides correctamente ensambladas podría incrementarse considerablemente si se utilizara ssDNA de un tamaño óptimo.

## **8.8 Pruebas de protección contra DNasa y caracterización mediante cromatografía de exclusión molecular y espectrofluorometría**

Para tener una mayor confianza en los datos y eliminar el ruido o complicaciones que nos ocasionaba la agarosa, así como también comprobar finalmente la capacidad de protección contra DNAsas de las VLP en base a la proteína VP2R12(C), se decidió repetir los ensambles, incubarlos con DNasa y posteriormente purificar las VLP por cromatografía de exclusión molecular. Para este experimento se utilizaron 3 controles: el primero fueron VLP de VP2R12(C) con DNA sin adición de DNasa, el segundo fueron VLP de VP2 con DNA sin adición de DNasa, y el tercero fueron VLP de VP2 con DNA a las cuales se les adicionó DNasa. Para estos ensambles, se usó una relación molar proteína:dsDNA de 8:1.

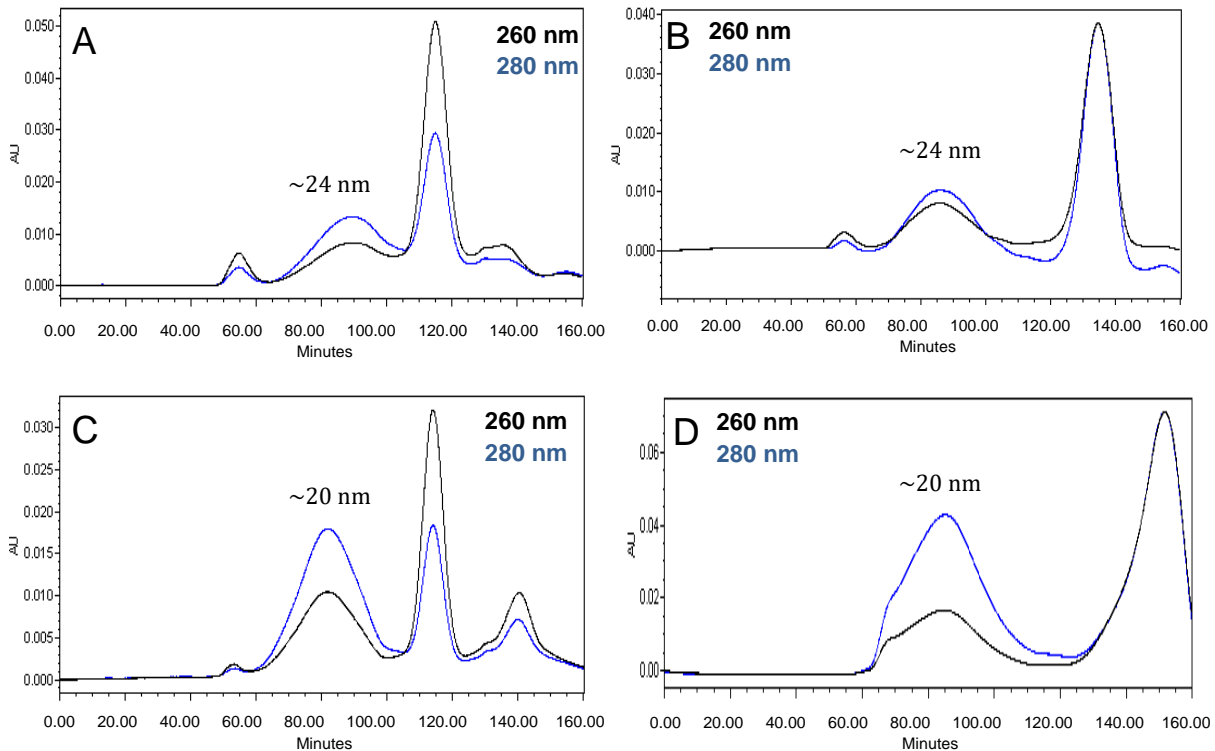
Lo primero que se encontró con este experimento fue que al analizar las VLP por DLS, se observó una población homogénea con diámetros de 24 nm, no obstante, una vez que estas se pasaron por el equipo de exclusión molecular se descubrió que solo las fracciones colectadas entre el minuto 85 a 90 presentaron tamaños de entre 20 a 24 nm al ser analizadas nuevamente por DLS. Como se observa en el cromatograma, esta región solo presentó un incremento mínimo en la absorbancia (Fig. 20). Es probable que, aunque por DLS se observó que la muestra tenía una población homogénea del tamaño esperado, la mayor proporción de la proteína realmente no estaba ensamblada. Después del minuto 120, en el mismo cromatograma apareció un pico con la mayor absorbancia tanto a 280 nm como 260 nm, el cual es probable que corresponda a capsómeros unidos a DNA, los cuales no lograron formar VLP. Por lo anterior, se decidió probar varias relaciones de VP2:VP2R12(C) en coensamble para tratar de obtener una mayor proporción de VLP ensambladas en la muestra. De esta forma se encontró que con una proporción 1:1 en el coensamble, se obtenía un incremento considerable en la población con el tamaño deseado.



**Figura 20.** Cromatograma de VLP de VP2R12(C) (100%) + dsDNA. Diámetros obtenidos por DLS: 1) 120 nm, fracciones colectadas del minuto 60 al 70. 2) 24 nm, fracciones colectadas del minuto 85 al 100. Volumen inyectado de muestra 4 mL, volumen total de la columna 120 mL, volumen vacío aproximado 45 mL, flujo 0.7 mL/min.

Con las condiciones encontradas se realizó el experimento, y en este se observaron dos cosas importantes: lo primero es que en la región donde salieron las poblaciones de partículas con 24 nm de diámetro hubo absorbancia a 280 y 260 nm, lo cual indica que probablemente las VLP si están encapsulando DNA (Fig. 21). Esto también se observa en los cromatogramas de VLP formadas únicamente con la proteína VP2, sin embargo, en éstas la relación proteína/DNA es menor comparada con la de los coensambles, de acuerdo a la señal de la absorbancia. El otro punto importante que se observó fue que aún en las muestras que se pusieron a digerir con benzonasa (Fig. 21B), la región con poblaciones de 24 nm de diámetro sigue teniendo absorbancia a 260 nm, lo cual nos indica que estas VLP si tienen la capacidad de proteger al DNA en su interior. Además, en ausencia de benzonasa se observó un pico que sale a los 115 min (Fig. 21A), y que en presencia de esta, se desplaza hasta los 135 min (Fig. 21B). Algo similar se observó en los cromatogramas de las VLP formadas con VP2. Al analizar las fracciones de los

picos obtenidos a 115 ó 135 minutos por DLS, se observaron poblaciones muy polidispersas. Con base en todo lo anterior, se llegó a la conclusión de que esos picos se trataban de capsómeros unidos a DNA, que al ser degradado por la benzonasa, las poblaciones disminuían de tamaño y por lo tanto eran retrasadas en su perfil de elución de la matriz.



**Figura 21.** Cromatogramas de VLP con dsDNA. A) Coensamble + DNA B) Coensamble + DNA + DNasa C) VP2 + DNA D) VP2 + DNA + DNasa. Volumen inyectado de muestra 4 mL, volumen total de la columna 120 mL, volumen vacío aproximado 45 mL, flujo 0.8 mL/min.

En nuestro grupo de trabajo se ha observado que ciertas nanopartículas (VLP, encapsulinas), con tamaños cercanos al límite superior de la superdex 200 (10 000 a 600 000 kDa), eluyen con un ligero retraso respecto al volumen muerto de la columna. Pueden ser distintos factores por los cuales nuestras partículas presentan cierta retención en la columna, pero esto es algo que también se ha observado en otros laboratorios (Puthenveetil & Vinogradova, 2013). En este caso, el pico donde eluyen las VLP es bastante amplio, lo cual podría deberse a que sean dos especies distintas que por estar cerca del límite de resolución de la columna, no lograron resolverse y se observan como un solo pico. No obstante, aquí es importante mencionar que para tener una mayor confianza en los datos de la cuantificación, solamente se utilizaron aquellas fracciones que al ser analizadas por DLS, presentaron poblaciones con tamaños de entre 20 y 24 nm. Por lo anterior, las fracciones utilizadas no abarcan todo el pico de elución mostrado en los cromatogramas, sino que solo una parte de este.

## 8.9 Cuantificación por espectrofluorometría del DNA encapsulado en las VLP de VP2R12(C) obtenidas por SEC

Todas las fracciones obtenidas con tamaños correspondientes a VLP se conservaron para su análisis por espectrofluorometría para determinar sus concentraciones de DNA, y además se cuantificó la proteína para establecer la relación entre estas (tablas 9 y 10). La razón por la cual se equilibró la columna superdex 200 con amortiguador PBS<sub>2x</sub> fue para cambiar el amortiguador de los coensambles debido a que el SDS precipita con el KCl, el cual se utiliza en el amortiguador de ensamble de estos. Una vez que se cuantificó el DNA de cada una de las muestras, estas se volvieron a concentrar para tener un valor más preciso de la concentración total de proteína.

**Tabla 9.** Curva patrón y datos de las muestras para cuantificación de DNA

[DNA] pmol	Intensidad	IntensidadStderror	-
0	10801.6	137.8	-
50	12260.8	113.6	-
100	15257.6	149.1	-
200	18404.8	198.3	-
300	23534.4	118.7	-
400	27541.6	231.4	-
Muestras	Intensidad	IntensidadStderror	DNA [pmoles / mL]
Coensamble + DNA	13560.0	130.9	709.9
Coensamble + DNA + DNasa	13329.8	138.2	655.6
VP2 + DNA + DNasa	13514.1	133.1	699.1
VP2 + DNA	12135.8	121.4	373.8

Valores ocupados para la medición en el espectrofluorómetro: excitación  $\lambda = 520$  nm, emisión  $\lambda = 600$ , temperatura 20° C. Los valores de cada muestra se tomaron por triplicado y el dato mostrado en la tabla es el promedio. mL totales de cada muestra: Coensamble + DNA, 4.5 mL; Coensamble + DNA + DNasa, 3.5 mL; VP2 + DNA + DNasa, 3.4 mL; VP2 + DNA, 3 mL.

**Tabla 10.** Curva patrón para la cuantificación de proteína por BCA.

[Albumina] ug	Absorbancia	-
0	0	-
20	0.028	-
40	0.055	-
60	0.08	-
100	0.12	-

Muestras	Absorbancia	Proteína [ $\mu\text{g} / \text{mL}$ ]
Coensamble + DNA	0.032	235
Coensamble + DNA + DNasa	0.015	93
VP2 + DNA + DNasa	0.09	718
VP2 + DNA	0.03	218

Temperatura de incubación de las muestras: 37° C por 30 min. mL totales de cada muestra: Coensamble + DNA, 1.8 mL; Coensamble + DNA + DNasa, 3.5 mL; VP2 + DNA + DNasa, 2.5 mL; VP2 + DNA, 2.5 mL.

**Tabla 11.** Relación molar DNA/proteína obtenida de las VLP aisladas por SEC

	[Proteína] $\mu\text{g}$	[Proteína] $\mu\text{M}$	[DNA] $\mu\text{M}$	DNA/Proteína
Coensamble (8:1)	423.0	1.55	0.710	0.458
Coensamble (8:1) + DNasa	326.0	1.54	0.655	0.425
VP2 + DNasa	1795.8	8.80	0.698	0.079
VP2	545.8	3.03	0.373	0.123

Las concentraciones de DNA que se presentan en la tabla fueron obtenidas a través de una curva patrón, realizada cuantificando la intensidad de fluorescencia. Las concentraciones de proteína que se presentan en la tabla fueron obtenidas a través de una curva patrón con albumina y medidos por el método de BCA.

Finalmente, con los resultados obtenidos en la tabla 11, se volvió a comprobar la capacidad mejorada de unión a dsDNA de la proteína VP2R12(C) en comparación con la proteína silvestre VP2. También con este experimento pudimos confirmar la capacidad de protección contra DNasas, ya que aún cuando también lo habíamos observado mediante los experimentos realizados por EMSA, estos tenían ciertas complicaciones que hacían que los datos obtenidos no fueran los más precisos. Sin embargo, en este experimento, al tener purificadas las VLP y en un amortiguador que no afectara las mediciones, se obtuvieron datos más precisos y confiables.

## 9. Conclusiones

- A partir de la proteína VP2R12(C) se pueden producir VLP *in vitro*. Probablemente debido al péptido rico en cargas, su ensamble requiere de una mayor fuerza iónica en el medio de diálisis, en comparación con el medio utilizado para ensamblar VLP de VP2. No obstante, para obtener un mayor porcentaje de VLP ensambladas, es conveniente coensamblar con la proteína VP2.
- La proteína VP2R12(C) presenta complicaciones para su sobreexpresión, su purificación y su manejo, por lo cual se tuvo que desarrollar una metodología completamente diferente para trabajar con ella. Además, también mostró ser problemática para su ensamble en VLP, ya que tiende a agregarse más fácilmente, dependiendo de las condiciones de ensamble.
- El péptido de unión a ácidos nucleicos (R12) mostró gran afinidad por el DNA de doble cadena y, a partir de los experimentos realizados, se pudo comprobar que el material genético sí es almacenado al interior de las VLP. Así mismo, una fracción de estas VLP logra protegerlo de DNAsas. Con lo cual, esta nueva proteína puede servir para empaquetar y proteger material genético heterólogo que podría ser de interés para terapia dirigida.
- La proteína VP2R12(N) no pudo ser producida, probablemente por problemas relacionados con su alta afinidad por el material genético y que el péptido R12, al estar en el extremo N terminal, afecta la producción inicial de la proteína.
- La proteína VP2R12(C) presentó además una característica interesante, ya que puede producir especies monodispersas de un mayor tamaño (mayor a 100 nm), dependiendo de las condiciones de ensamble.

## 10. Perspectivas

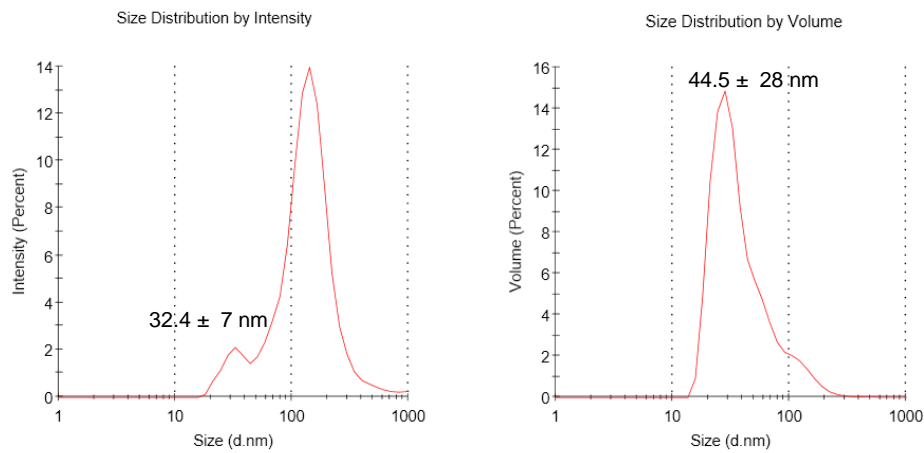
Con la finalidad de reducir las complicaciones para la sobre expresión y purificación de la proteína VP2R12(C), sería ideal probar otros péptidos, los cuales tuvieran una menor afinidad por el DNA. Esto evitaría que la proteína pudiera tener DNA unido aun después de su purificación y, por otra parte, si se busca desarrollar un sistema de entrega de material genético, lo ideal es que tenga una menor afinidad por el material genético para que al desensamblarse lo libere con facilidad.

El siguiente paso del proyecto, y además una forma de probar estas nuevas VLP, sería ensamblarlas con mRNA o microRNA cuya presencia en una célula se pueda detectar de manera sencilla experimentalmente, y realizar pruebas en líneas celulares para ver el comportamiento que tienen dentro estos sistemas. La eficiencia en la entrega y liberación de estos ácidos nucleicos podría optimizarse para desarrollar una plataforma de entrega de estas moléculas con fines teranósticos en medicina.

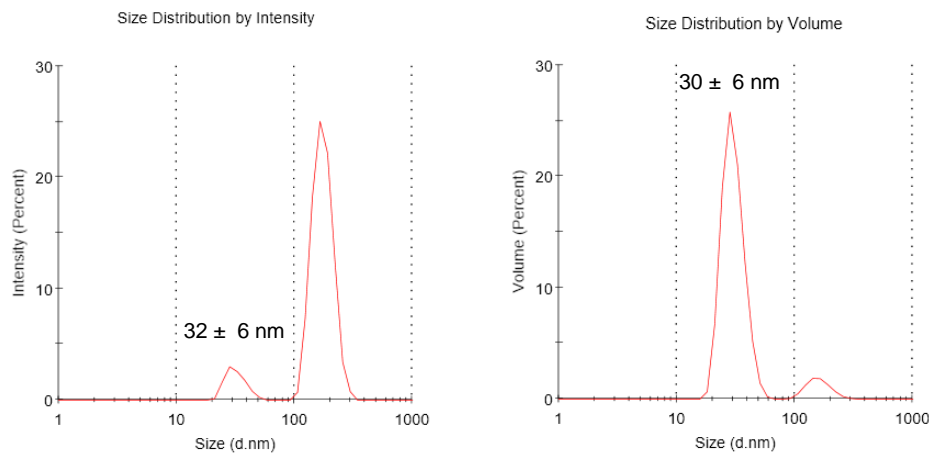


## 11. ANEXO

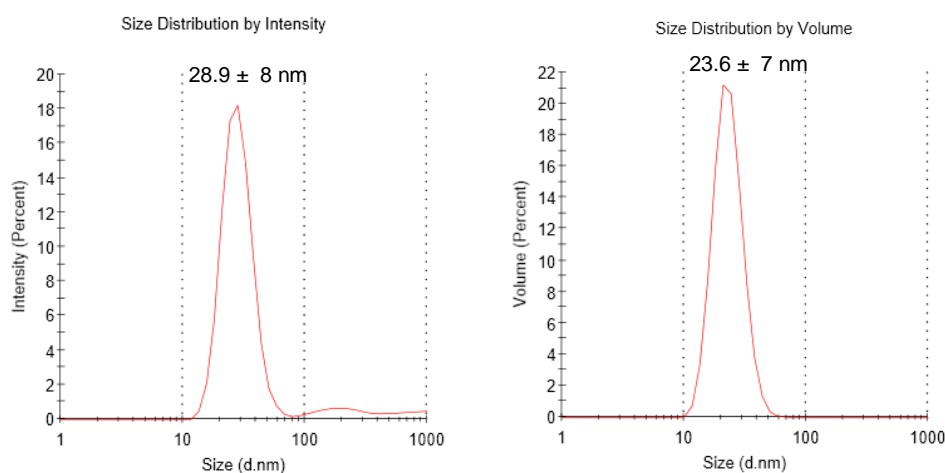
A)



B)



Anexo 1. Distribución de tamaños por intensidad y volumen de las VLP de coensamble VP2 + VP2R12(C) dializados en PBS<sub>2x</sub>. A) Coensamble VP2 50 % + VP2R12 50% Z- Average  $94.3 \pm 61 \text{ nm}$ , Pdi 0.4 D) Coensamble VP2 60 % + VP2R12 40% Z-Average  $134 \pm 83 \text{ nm}$ , Pdi 0.39, con DNA Z-value 13.8, Pdi 1. Los gráficos mostrados son un promedio de 10 mediciones.



Anexo 2. Distribución de tamaños por intensidad y volumen de las VLP en base a la proteína VP2. A) Dializado contra un amortiguador 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 M NaCl, 200 mM L-Arg pH 7.4 Z- Average 23.6 ± 15 nm, Pdi 0.44 Los gráficos mostrados son un promedio de 10 mediciones.

### Anexo 3 - Obtención de células quimio competentes de *E. coli*

Para poder transformar los plásmidos de ambas construcciones, primero fue necesario producir células quimio competentes de *E. coli* DH5α y BL21(DE3). Para la obtención de estas células competentes se utilizó el siguiente protocolo:

#### **Protocolo para la obtención de células quimio competentes**

1. Se tomó un vial con 50 µL de la cepa de interés de *E. coli* (almacenadas a -70°C) y se colocó en hielo. En condiciones de esterilidad se inoculó en un tubo con 10 mL de medio LB sin antibiótico. Este se dejó creciendo durante toda la noche.
2. Al día siguiente, del cultivo obtenido se tomaron 500 µL y se inocularon en un matraz con 50 mL de medio LB sin antibiótico en condiciones de esterilidad. Este se dejó crecer a 37°C con agitación orbital a 250 r.p.m. hasta que llegó a la densidad óptica de 0.4 a 600 nm. Una vez en esta densidad, se puso el matraz en hielo por 20 min.
3. Después de este tiempo, se procedió a centrifugar las células a 6000 r.p.m. durante 5 min a 4°C en una centrifuga refrigerada (Thermo Scientific Instruments). Con el pellet obtenido se decantó el sobrenadante y se resuspendió en 20 mL de una solución estéril de CaCl<sub>2</sub> 60 mM con glicerol al 20 % (previamente enfriada en hielo).
4. Nuevamente se procedió a centrifugar las células a 6000 r.p.m. durante 5 min a 4°C. Con el pellet obtenido se decantó el sobrenadante y se resuspendió en 20 mL de la misma solución del paso 3. Este paso se realizó por duplicado.
5. Se dejó reposar en hielo a las células resuspendidas en la solución de CaCl<sub>2</sub> por otros 15 min. Pasado este tiempo, se las volvió a centrifugar a 6000 r.p.m. durante 5 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 3

mL de la misma solución del paso 3. A partir de este paso las células se mantuvieron en hielo.

6. Las células se alicuotaron en volúmenes de 50  $\mu$ L en tubos eppendorf de 0.6 mL. Una vez alicuotadas las células, se las puso inmediatamente en una solución de metanol a la cual se le agregó previamente hielo seco para congelar los tubos. Estos fueron almacenados en un ultra congelador a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### Anexo 4 - Transformación de células quimio competentes de *E. coli* BL21(DE3)

Los plásmidos con ambas construcciones fueron transformados en *E. coli* BL21(DE3) para poder expresar ambas proteínas, y en *E. coli* DH5 $\alpha$  para poder recuperar los plásmidos y tenerlos como reserva. Para la transformación se utilizaron células quimio competentes de ambas cepas (previamente producidas) siguiendo el siguiente protocolo:

##### **Protocolo de transformación en células quimio competentes**

1. Se tomó un tubo con 50  $\mu$ L de células quimiocompetentes de *E. coli*, almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  y se colocaron en hielo por 5 minutos. En condiciones de esterilidad se les agregaron 1  $\mu$ L del vector ligado y se incubaron en hielo por 30 min.
2. Una vez que pasó el primer tiempo de incubación, las células se incubaron rápidamente en un Thermomixer previamente calentado a  $42^{\circ}\text{C}$  por 30 s para generar el choque térmico.
3. Después del choque térmico se volvió a poner en hielo el tubo por 5 min y nuevamente en condiciones de esterilidad se le agregaron 500  $\mu$ L de medio LB sin antibiótico.
4. Una vez mezclado el medio con las células se procedió a incubar el tubo a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 h con agitación orbital a 250 r.p.m.
5. Después de esta etapa de recuperación se procedió a inocular las células en placas de medio LB con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), para lo cual se pusieron 50  $\mu$ L del medio con células en cada caja y se lo distribuyó mediante perlas de vidrio estériles para favorecer la obtención de colonias aisladas.
6. Las cajas se colocaron en la incubadora y se dejaron creciendo por 16 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Una vez que pasó el tiempo de incubación se observaron las cajas que presentaron colonias y se las colocó en el cuarto frío a  $4^{\circ}\text{C}$  para retrasar su crecimiento.

Una vez que se obtuvieron colonias transformadas de *E. coli* DH5 $\alpha$ , se procedió a obtener su DNA plasmídico para su almacenamiento y para el análisis de la construcción por PCR. Para esto se siguió el siguiente protocolo:

##### **Protocolo de purificación de DNA plasmídico (fenol/cloroformo)**

2. De las cajas obtenidas, se seleccionaron varias colonias aisladas y se las puso a crecer en tubos de 10 mL con medio LB con ampicilina (100 µg/mL) hasta que alcanzaron una densidad óptica de 0.6 a 600 nm.
3. Del cultivo se tomó 1 mL y se centrifugó en un tubo eppendorf de 1.5 mL a 9000 r.p.m. durante 2 min, se descartó el sobrenadante y sobre este mismo tubo se puso otro mL del cultivo y se volvió a centrifugar (Este paso se repitió una vez más).
4. Al pellet obtenido se lo resuspendió en 100 µL de una solución para lisis celular, compuesta por 50 mM de glucosa, 25 mM de Tris-HCL pH 8, 10 mM de EDTA y 5 mg/mL de lisozima. Ya mezclado se incubó a 37°C durante 40 min.
5. Una vez que pasó el tiempo de incubación, se le adicionaron 200 µL de una solución recién preparada de NaOH 0.2 M y SDS al 4%. Se utilizó un vortex para homogenizar la solución y se la puso a incubar en hielo durante 10 min.
6. Después de que transcurrieron los 10 min se le agregaron 150 µL de una solución 5 M de acetato de potasio (pH 5) y nuevamente se puso a incubar por otros 10 min.
7. Para separar el DNA plasmídico de los restos celulares, se centrifugó la muestra a 14000 r.p.m. durante 5 min a temperatura ambiente. Al final se tomaron 400 µL del sobrenadante y se los puso en un tubo nuevo.
8. A este sobrenadante se le agregaron 200 µL de fenol saturado de amortiguador y se mezcló invirtiendo el tubo suavemente, de igual forma se le agregaron 200 µL de cloroformo y se mezcló suavemente. Para separar el DNA plasmídico de proteínas y otros restos celulares se volvió a centrifugar como en el paso 6.
9. Una vez que terminó la centrifugación se formaron dos fases, la fase superior que es la fase acuosa, es la que contiene el DNA plasmídico. De ésta, se tomó el mayor volumen posible tratando de no revolverla con la otra fase.
10. Para precipitar el DNA plasmídico de esta fase, se mezcló con un volumen igual de isopropanol en un tubo nuevo y se lo dejó incubando a 5°C por 3 h.
11. Posteriormente se recolectó el DNA plasmídico mediante centrifugación (14000 r.p.m. durante 15 min) a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y al pellet obtenido se lavó con etanol al 80. Este paso se repitió 2 veces. Por último, el DNA se secó al vacío en el equipo de liofilización Speed Vac.
12. Finalmente, se resuspendió el DNA plasmídico en 25 µL de agua desionizada estéril y se le agregó 0.5 µL de RNAsa para eliminar cualquier resto de RNA que pudiera tener. Se incubó por 1 h a 37°C antes de guardarlo.

Con el DNA plasmídico ya purificado se procedió a realizar una prueba de digestión para comprobar que nuestro vector realmente contenía el inserto de interés, nuevamente se utilizaron las enzimas *XhoI* y *NdeI* y se incubaron a 37°C por 3 h, el producto obtenido se analizó por electroforesis en gel de agarosa (1%) y se analizó en un trans-iluminador UV. Una vez que se comprobó cuáles fueron los plásmidos que liberaron el inserto, De las cajas obtenidas se eligió una colonia aislada, a la cual se le extrajo su DNA plasmídico mediante el Kit Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep de Jena Bioscience y se envió a secuenciar para comprobar que no había alguna mutación en la secuencia.

## 12. Referencias

- What is Biotechnology? Biotechnology Innovation Organization. <https://www.bio.org/what-biotechnology> Fecha de acceso: Abril 20, 2020.
- What is nanotechnology? National Nanotechnology Initiative. <http://nano.gov/nanotech-101/what/definition>. Fecha de acceso: Abril 20, 2020.
- Arevalo M., Wong T., & Ross, T. (2016). Expression and Purification of Virus-like Particles for Vaccination. *Journal of visualized experiments*. Volume 112, pp 54041.
- Balhorn R. (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome biology*. Volume 8(9), pp. 227.
- Bideshi D., Spears T., Zaghloul H., Tan Y., Bigot Y. & Federici B. (2018) Ascovirus P64 Homologs: A Novel Family of Large Cationic Proteins That Condense Viral Genomic DNA for Encapsulation. MDPI - *Biology*. Volume 7(3), pp 44.
- Bloomfield V. (1997). DNA condensation by multivalent cations. *Biopolymers*. Volume 44(3), pp 269–282.
- Brewer L., Corzett M., Lau E. & Balhorn R. (2003) Dynamics of Protamine 1 Binding to Single DNA Molecules. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 278(43), pp. 42403–42408.
- Brunel F., Lewis J., Destito G., Steinmetz N., Manchester M., Stuhlmann H. & Dawson P. (2010) Hydrazone ligation strategy to assemble multifunctional viral nanoparticles for cell imaging and tumor targeting. *Nano Lett*. Volume 10(3), pp 1093–1097.
- Cadena-Nava R., Comas-Garcia M., Garmann R., Rao ALN, Knobler CM, Gelbart WM. (2012) Self-Assembly of Viral Capsid Protein and RNA Molecules of Different Sizes: Requirement for a Specific High Protein/RNA Mass Ratio. *J Virol*. Volume 86, pp 3318–3326.
- Castellanos, M., Pérez, R., Carrillo, P. J., de Pablo, P. J., & Mateu, M. G. (2012). Mechanical disassembly of single virus particles reveals kinetic intermediates predicted by theory. *Biophysical journal*. Volume 102(11), pp 2615–2624.
- Caspar D. & Klug A. (1962) Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. Volume 27, pp 1-24.
- Cayetano-Cruz M., Coffeen CF., Valadez-García J., Montiel C., Bustos-Jaimes I (2018) Decoration of virus-like particles with an enzymatic activity of biomedical interest. *Virus Res*. Volume 15(255), pp 1-9.
- Chatterji A., Ochoa W., Paine M., Ratna B., Johnson J. & Lin T.(2004) New addresses on an addressable virus nanoblock: Uniquely reactive Lys residues on cowpea mosaic virus. *J Chem Biol*. Volume 11(6), pp 855–863.
- Chatterji A., Ochoa W., Shamieh L., et al. (2004) Chemical conjugation of heterologous proteins on the surface of cowpea mosaic virus. *Bioconjug Chem*. Volume 15(4), pp 807–813.
- Chelikani V., Ranjan T. & Kondabagil K. (2014) Revisiting the genome packaging in viruses with lessons from the “Giants”. *Virology*. Volumes 466–467, pp 15-26.

- Chen L., Wang M., Ou W., Fung C., Chen P., Chang C., Huang W., Wang J., Lin P. & Chang D. (2010) Efficient gene transfer using the human JC virus-like particle that inhibits human colon adenocarcinoma growth in a nude mouse model. *Gene Therapy*. Volume 17(8), pp 1033–1041.
- Cotmore S., Agbandje-McKenna M., Chiorini J., Mukha D., Pintel D., Qiu J., Soderlund-Venermo M., Tattersall P., Tijssen P., Gatherer D., Davison A. (2014) The family Parvoviridae. *Arch Virol*. Volume 159(5), pp 1239-1245.
- Cotmore S. & Tattersall P. (2013). Parvovirus diversity and DNA damage responses. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. Volume 5(2), pp 012989
- Cotmore S., & Tattersall P. (2014) Parvoviruses: Small Does Not Mean Simple. *Annual Review of Virology*. Volume 1, pp 517-537.
- Choi E., Jung D., Kim J. Lee Y. & Kim B. (2018) Chemoselective Tyrosine Bioconjugation through Sulfate Click Reaction. *Chemistry Europe*. Volume 24(43), pp 10948-10952.
- Dahman Y. (2017) *Nanotechnology and Functional Materials for Engineers (Micro and Nano Technologies)*. Chapter 1 - An Introduction to Nanotechnology; pp 1-17.
- Das C. & Frankel A. (2003). *Sequence and structure space of RNA-binding peptides*. *Biopolymers*. Volume 70(1), pp 80–85.
- Del Alamo M., Mateu M. (2005) Electrostatic Repulsion, Compensatory Mutations, and Long-range Non-additive Effects at the Dimerization Interface of the HIV Capsid Protein. *J Mol Biol*. Volume 345, pp 893–906.
- Diaz D., Care A., & Sunna A. (2018). Bioengineering Strategies for Protein-Based Nanoparticles. *Genes (Basel)*. Volume 9(7), pp. 370.
- Ding X., Liu D., Booth G., Gao W. & Lu Y. (2018) Virus-Like Particle Engineering: From Rational Design to Versatile Applications. *Biotechnol J*. Volume 13(5), pp e1700324.
- Deng Y., Zeng J., Su H., Qu Q. (2015) Recombinant VLP-Z of JC Polyomavirus: A Novel Vector for Targeting Gene Delivery. *Intervirology*. Volume 58(6), pp 363-368.
- Fang P., Gómez Ramos L., Holguin S., Hsiao C., Bowman, J., Yang H., & Williams L. (2016). Functional RNAs: combined assembly and packaging in VLPs. *Nucleic acids research*. Volume 45(6), pp 3519-3527.
- Fraenkel-Conrat H. & Williams R. (1955) Reconstitution of Active Tobacco Mosaic Virus from Its Inactive Protein and Nucleic Acid Components. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Volume 41(10), pp 690–698.
- Fuenmayor J., Gòdia F. & Cervera L. (2017). Production of virus-like particles for vaccines. *New biotechnology*. Volume 39(Pt B), pp 174–180.
- Galaway F. & Stockley P. (2013) MS2 viruslike particles: a robust, semisynthetic targeted drug delivery platform. *Mol Pharm*. Volume 10(1): pp 59–68.
- Ganaie S. & Qiu J. (2018). Recent Advances in Replication and Infection of Human Parvovirus B19. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. Volume 8, pp 166.

- Garmann R., Comas-Garcia M, Koay M., Cornelissen J., Knobler C. & Gelbart W. (2014) The Role of Electrostatics in the Assembly Pathway of a Single-Stranded RNA Virus. *J Virol.* Volume 88(18), pp 10472-9.
- Garmann R., Comas-Garcia M., Gopal A., Knobler C, Gelbart W. (2014) The Assembly Pathway of an Icosahedral Single-Stranded RNA Virus Depends on the Strength of Inter-Subunit Attractions. *J Mol Biol.* Volume 426, pp 1050–1060.
- Garmann R., Gopal A., Athavale S., Knobler C., Gelbart W. & Harvey S. (2015). Visualizing the global secondary structure of a viral RNA genome with cryo-electron microscopy. *RNA (New York, N.Y.)*. Volume 21(5), pp 877–886.
- Gillitzer E., Willits D., Young M. & Douglas T. (2002) Chemical modification of a viral cage for multivalent presentation. *Chem Commun.* Volume 20, pp 2390–2391.
- Gusić N., Ivković A., VaFaye J., Vukasović A. , Ivković J., Hudetz D. & Janković S (2014) Nanobiotechnology and bone regeneration: a mini-review *International Orthopaedics (SICOT)*. Volume 38(9), pp 1877–1884.
- Hagan M. (2010). Understanding the Concentration Dependence of Viral Capsid Assembly Kinetics - the Origin of the Lag Time and Identifying the Critical Nucleus Size. *Biophys J.* Volume 98, pp 1065–1074.
- Hagan M. (2014). Modeling Viral Capsid Assembly. *Advances in chemical physics.* Volume 155, pp 1–68.
- Halder S., Nam H., Govindasamy L., Vogel M., Dinsart C., Salomé N., McKenna R. & Agbandje-McKenna M. (2013) Structural Characterization of H-1 Parvovirus: Comparison of Infectious Virions to Empty Capsids. *Journal of virology.* Volume 87(9), pp 5128-40
- Harbison C., Chiorini J. & Parrish C. (2008): The parvovirus capsid odyssey: from the cell surface to the nucleus. *Trends Microbiol.* Volume 16, pp 208–214.
- Heegaard E. & Brown K. (2002). Human Parvovirus B19. *Clinical Microbiology Reviews.* Volume 15(3), pp 485–505.
- Hernandez-Garcia A., Kraft D., Janssen A., Bomans P., Sommerdijk N., Thies-Weesie D., Favretto M., Brock R., de Wolf F., Werten M., van der Schoot P., Stuart M., de Vries R. (2014) Design and self-assembly of simple coat proteins for artificial viruses. *Nat Nanotechnol.* Volume 9(9), pp 698-702.
- Hernandez-Garcia A., Estrich NA, Werten MW, Van Der Maarel JR, LaBean T., de Wolf F., Cohen Stuart M. & de Vries R. (2017) Precise Coating of a Wide Range of DNA Templates by a Protein Polymer with a DNA Binding Domain. *ACS Nano.* Volume 11(1), pp144-152.
- Hoffmann D., Böker K., Schneider S., Eckermann-Felkl E., Schuder A., Komrakova M., Sehmisch S., Gruber J. (2016). In Vivo siRNA Delivery Using JC Virus-like Particles Decreases the Expression of RANKL in Rats. *Molecular Therapy Nucleic Acids.* Volume 5(3), pp e298.
- Hu T. & Shklovskii B. (2007) Kinetics of viral self-assembly: Role of the single-stranded RNA antenna. *Phys Rev E.* Volume 75, pp 051901.
- Hu T., Zhang R, Shklovskii BI. 2008. Electrostatic theory of viral self-assembly. *Physica A.* Volume 387: pp 3059–3064.

Huang P., Boyken S. & Baker D. (2016) The coming of age of de novo protein design. *Nature*. Volume 537(7620), pp 320-327.

Imai, K.; Kamio, N.; Cueno, M.E.; Saito, Y.; Inoue, H.; Saito, I.; Ochiai, K. (2014) Role of the histone H3 lysine 9 methyltransferase Suv39 h1 in maintaining Epstein-Barr virus latency in B95-8 cells. *FEBS J*. Volume 281, pp 2148–2158.

Iwazaki T., Li X., & Harada K. (2005). Evolvability of the mode of peptide binding by an RNA. *RNA (New York, N.Y.)*. Volume 11(9), pp 1364–1373.

Jariyapong P, Chotwiwatthanakun C., Somrit M., Jitrapakdee S., Xing L., Cheng H., Weerachatanukul W. (2014) Encapsulation and delivery of plasmid DNA by virus-like nanoparticles engineered from *Macrobrachium rosenbergii* nodavirus. *Virus Research*. Volume 179, pp. 140-146

Jeevanandam J., Pal K., & Danquah M. K. (2019). Virus-like nanoparticles as a novel delivery tool in gene therapy. *Biochimie*. Volume 157, pp 38-47.

Jeng M., Ali I. & Ott M. (2015) Manipulation of the host protein acetylation network by human immunodeficiency virus type 1. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*. Volume 50, pp 314–325.

Kaufmann B., Chipman P., Kostyuchenko V., Modrow S. & Rossmann M. (2008) Visualization of the Externalized VP2 N Termini of Infectious Human Parvovirus B19. *Journal of virology*. Volume 82(15), pp 7306–7312.

Kaufmann B., Simpson A., & Rossmann M. (2004). The structure of human parvovirus B19. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Volume 101, pp 11628–11633.

Kobayashi N. & Arai R. (2017) Design and construction of self-assembling supramolecular protein complexes using artificial and fusion proteins as nanoscale building blocks. *Curr Opin Biotechnol*; Volume 46, pp 57-65

Kolb H., Finn M., Sharpless K. (2001) Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. Volume 40(11), pp 2004–2021.

La Bella F & Vesco, C. (1980) Late modifications of simian virus 40 chromatin during the lytic cycle occur in an immature form of virion. *J. Virol*. Volume 33, pp 1138–1150.

Lee, E., Lee, N. & Kim, I. (2016). Bioengineered protein-based nanocage for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Volume 106, pp 157–171.

Liu F., Ge S., Li L., Wu X., Liu Z., & Wang, Z. (2012). Virus-like particles: Potential veterinary vaccine immunogens. *Research in Veterinary Science*. Volume 93, pp 553–559.

Liu Z., Qiao J., Niu Z. & Wang Q. (2012) Natural supramolecular building blocks: from virus coat proteins to viral nanoparticles. *Chem Soc Rev*. Volume 41(18), pp 6178-94.

Lošdorfer Božič, A., & Podgornik, R. (2018). Varieties of charge distributions in coat proteins of ssRNA+ viruses. *Journal of physics. Condensed matter: an Institute of Physics journal*. Volume 30(2), pp 024001.

Low J. & Weeks K. (2010) SHAPE-directed RNA secondary structure prediction. *Methods*. Volume 52(2), pp 150-8.



- Lu X., Thompson J. & Perry K. (2012) Encapsidation of DNA, a protein and a fluorophore into virus-like particles by the capsid protein of cucumber mosaic virus. *Journal of general virology*. Volume 93(5), pp 1120-1126
- Lutomski C., Lykтей N., Pierson E., Zhao Z., Zlotnick A. & Jarrold, M. (2018). Multiple Pathways in Capsid Assembly. *Journal of the American Chemical Society*. Volume 140(17), pp 5784–5790.
- Mani B., Baltzer C., Valle N., Almendral J., Kempf C. & Ros C. (2006) Low pH-dependent endosomal processing of the incoming parvovirus minute virus of mice virion leads to externalization of the VP1 N-terminal sequence (N-VP1), N-VP2 cleavage, and uncoating of the full-length genome. *J. Virol.* Volume 80, pp 1015–1024.
- Natilla A., Murphy C. & Hammond R. (2015) Mutations in the alpha-helical region of the amino terminus of the Maize rayado fino virus capsid protein and CP:RNA ratios affect virus-like particle encapsidation of RNAs. *Virus Research*. Volume 196, pp 70-78
- Nash M. & Shoseyov O. (2016) Editorial overview: Nanobiotechnology at a crossroads: moving beyond proof of concept. *Current Opinion in Biotechnology*. Volume 39, pp 7-9.
- Ni P. & Kao C. (2013) Non-encapsidation activities of the capsid proteins of positive-strand RNA viruses *Virology*. Volume 446, pp 123–32.
- Mahmoudabadi G. & Phillips R. (2018). A comprehensive and quantitative exploration of thousands of viral genomes. *eLife*. Volume 7, pp e31955.
- Mäntylä E., Kann M., & Vihinen-Ranta M. (2017). Protoparvovirus Knocking at the Nuclear Door. *Viruses*. Volume 9(10), pp 286.
- Masavuli M., Wijesundara D., Torresi J, Gowans E. & Grubor-Bauk B.(2017) Preclinical Development and Production of Virus-Like Particles As Vaccine Candidates for Hepatitis C. *Front. Microbiol.* Volume 8, pp 2413.
- Mateu M. (2013) Assembly, stability and dynamics of virus capsids. *Arch Biochem Biophys*. Volume 531(1-2), pp 65-79.
- McKay C. & Finn MG. (2014) Click chemistry in complex mixtures: bioorthogonal bioconjugation. *Chem Biol*. Volume 21(9), pp1075-101
- McPherson A. (2005) Micelle formation and crystallization as paradigms for virus assembly. *Bioessays*. Volume 27, pp 447–458
- Mohsen M., Zha L., Cabral-Miranda G., Bachmann M. (2017) Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. *Semin Immunol*. Volume 34, pp 123-132.
- Ouyang, T., Liu, X., Ouyang, H., & Ren, L. (2018). Recent trends in click chemistry as a promising technology for virus-related research. *Virus research*. Volume 256, pp 21–28.
- Ozawa K. & Young N. (1987) Characterization of capsid and noncapsid proteins of B19 parvovirus propagated in human erythroid bone marrow cell cultures. *J. Virol.* Volume 61, pp 2627–2630.
- Parent K. & Teschke C. (2007) GroEL/S substrate specificity based on substrate unfolding propensity. *Cell Stress Chaperones*. Volume 12(1), pp 20–32.

- Pattenden K., Middelberg P., Niebert M. & Lipin D. (2005) Towards the preparative and large-scale precision manufacture of virus-like particles. *Trends Biotechnol.* Volume 23 (10), pp. 523-529.
- Patterson D. (2018) Encapsulation of Active Enzymes within Bacteriophage P22 Virus-Like Particles. *Protein Scaffolds.* Volume 1798, pp. 11-24
- Patolsky F., Timko B., Yu G., Fang Y., Greytak A., Zheng G., Lieber C. (2006) Detection, stimulation, and inhibition of neuronal signals with high-density nanowire transistor arrays. *Science.* Volume 313(5790), pp 1100–1104.
- Perlmutter, J., Qiao, C. & Hagan, M. F. (2013). Viral genome structures are optimal for capsid assembly. *ELife.* Volume 2, pp e00632
- Perlmutter J., & Hagan, M. (2015). Mechanisms of virus assembly. *Annual review of physical chemistry.* Volume 66, pp 217–239.
- Pokorski J.K., & Steinmetz N. (2011) The Art of Engineering Viral Nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics.* Volume 8(1), pp 29–43.
- Pomwised R, Intamaso U, Teintze M., Young M. & Pincus S. (2016) Coupling peptide antigens to virus-like particles or to protein carriers influences the Th1/Th2 polarity of the resulting immune response. *Vaccines.* Volume 4(2), pp 15.
- Prevelige P., Thomas D. & King J. (1993) Nucleation and Growth Phases in the Polymerization of Coat and Scaffolding Subunits into Icosahedral Procapsid Shells. *Biophys J.* Volume 64, pp 824–835.
- Puthenveetil R. & Vinogradova O. (2013) Optimization of the design and preparation of nanoscale phospholipid bilayers for its application to solution NMR. *Proteins.* Volume 81(7): pp 1222-1231.
- Ream J., Lewis L. & Lewis K. (2016) Rapid agarose gel electrophoretic mobility shift assay for quantitating protein: RNA interactions. *Analytical biochemistry.* Volume 511, pp 36–41.
- Requião R., Carneiro R., Moreira M., Ribeiro-Alves M., Rossetto S., Palhano F. & Domitrovic T. (2020) Viruses with different genome types adopt a similar strategy to pack nucleic acids based on positively charged protein domains. *Scientific reports.* Volume 10(1), pp 5470.
- Rogo L., Mokhtari-azad T., Kabir M. & Rezaei F. (2014) Human parvovirus B19: A review. *Acta virológica.* Volume 58, pp 199 – 213.
- Rohovie M., Nagasawa M., & Swartz J. R. (2017). Virus-like particles: Next-generation nanoparticles for targeted therapeutic delivery. *Bioengineering & translational medicine.* Volume 2(1), 43–57.
- Ros C., Gerber M., Kempf C. (2006) Conformational changes in the VP1-unique region of native human parvovirus B19 lead to exposure of internal sequences that play a role in virus neutralization and infectivity. *J Virol.* Volume 80(24), pp 12017-24.
- Saini V., Zharov V., Brazel C., Nikles D., Johnson D., Everts M. (2006) Combination of viral biology and nanotechnology: new applications in nanomedicine. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* Volume 2(3), pp 200-206.
- Sánchez-Rodríguez S., Münch-Anguiano L., Echeverría O., Vázquez-Ninb G., Mora-Pale M., Dordick J., Bustos-Jaimes I. (2012) Human parvovirus B19 virus-like particles: In vitro assembly and stability. *Biochimie.* Volume 94, pp 870-878.

Santillán J., Valadez J., Morán A., Santillán H., Bustos-Jaimes I. (2015) Peptide display on a surface loop of human parvovirus B19 VP2: Assembly and characterization of virus-like particles. *Virus Research*. Volume 201, pp 1-7.

Segura M.; Garnier A.; Di Falco M.R.; Whisell, G.; Meneses-Acosta A.; Archand N.; Kamen A. (2008) Identification of host proteins associated with retroviral vector particles by proteomic analysis of highly purified vector preparations. *J. Virol.* Volume 82, pp 1107–1117.

Seow Y. & Wood M. (2009). Biological gene delivery vehicles: Beyond viral vectors. *Molecular Therapy*. Volume 17, pp 767–777.

Speir J. & Johnson J. (2013) Nucleic Acid Packaging in Viruses. *Curr Opin Struct Biol.* Volume 22(1), pp. 65–71.

Stockley PG, Twarock R, Bakker SE, Barker AM, Borodavka A, et al. (2013) Packaging signals in single-stranded RNA viruses: nature's alternative to a purely electrostatic assembly mechanism. *J Biol Phys.* Volume 39, pp 277–287.

Storni T., Lechner F., Erdmann I., Bächli T., Jegerlehner A., Dumrese T, Kündig T, Ruedl C. & Bachmann M. (2002) Critical role for activation of antigen-presenting cells in priming of cytotoxic T cell responses after vaccination with virus-like particles. *J. Immunol.* Volume 168, pp 2880–2886.

Strable E., Prasuhn D. Jr, Udit A., Brown S., Link A., Ngo J., Lander G., Quispe J., Potter C., Carragher B, Tirrell D., Finn M. (2008) Unnatural amino acid incorporation into virus-like particles. *Bioconjug Chem.* Volume 19(4): pp 866-75.

Strobl, F., Ghorbanpour, S. M., Palmberger, D., & Striedner, G. (2020). Evaluation of screening platforms for virus-like particle production with the baculovirus expression vector system in insect cells. *Scientific reports*. Volume 10(1), pp 1065.

Stubbs G., Kendall A. (2012) Helical Viruses. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Volume 726, pp 631-58.

Sun S., Rao V. B. & Rossmann M. (2010). Genome packaging in viruses. *Current opinion in structural biology*. Volume 20(1), pp 114–120.

Takamoto K., Das R., He Q., Doniach S., Brenowitz M., Herschlag D. & Chance M. (2004) Principles of RNA Compaction: Insights from the Equilibrium Folding Pathway of the P4-P6 RNA Domain in Monovalent Cations. *Journal of molecular biology*. Volume 343(5), pp 1195-1206.

Toita, R., Murata, M., Abe, K., Narahara, S., Piao, J. S., Kang, J.-H., & Hashizume, M. (2013). A nanocarrier based on a genetically engineered protein cage to deliver doxorubicin to human hepatocellular carcinoma cells. *Chemical Communications*. Volume 49(67), pp 7442.

Tu M., Liu F., Chen S., Wang M., & Cheng A. (2015). Role of capsid proteins in parvoviruses infection. *Virology journal*. Volume 12, pp 114.

Voronkova T., Kazaks A., Ose V., Özel M., Scherneck S., Pumpens P. & Ulric R. (2007) Hamster polyomavirus-derived virus-like particles are able to transfer in vitro encapsidated plasmid DNA to mammalian cells. *Virus Genes*. Volume 34(3), pp 303–314.

Wang W., Chen C., Lin K., Fang Y. & Lieber C. (2005). Label - free detection of small-molecule–protein interactions by using nanowire nanosensors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Volume 102(9), pp 3208–3212.

- Wang M.; Tuladhar E.; Shen S.; Wang H.; van Oers M.; Vlak J.; Westenberg M. (2010) Specificity of baculovirus P6.9 basic DNA-binding proteins and critical role of the C terminus in virion formation. *J. Virol.* Volume 84, pp 8821–8828.
- Wen A., & Steinmetz N. (2016). Design of virus-based nanomaterials for medicine, biotechnology, and energy. *Chemical Society reviews.* Volume 45(15), pp 4074-4126.
- White J. & Whittaker G. (2016). Fusion of Enveloped Viruses in Endosomes. *Traffic (Copenhagen, Denmark).* Volume 17(6), pp 593-614.
- Whitelam S. and Jack R. (2015) The Statistical Mechanics of Dynamic Pathways to Self-assembly. *Ann Rev Phys Chem.* Volume 66, pp 143-163.
- Wilson D. (2016). Protruding Features of Viral Capsids Are Clustered on Icosahedral Great Circles. *PloS one.* Volume 11(4): e0152319. doi:10.1371/journal.pone.0152319
- Wilson M.; Mainprizw, T.H.; Friesen, P.D.; Miller, L.K. (1987) Location, transcription, and sequence of a baculovirus gene encoding a small arginine-rich polypeptide. *J. Virol.* Volume 61, pp 661–666.
- Wilson M.; Price, K.H. (1988) Association of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus with nuclear matrix. *Virology.* Volume 167, pp 233–341.
- Wu Z., Chen K., Yildiz I., Dirksen A., Fischer R., Dawson P. & Steinmetz N. (2012). Development of viral nanoparticles for efficient intracellular delivery. *Nanoscale.* Volume 4(11), pp 3567–3576.
- Yao Y., Jia T., Pan Y., Gou H., et al. (2015) Using a novel microRNA delivery system to inhibit osteoclastogenesis. *Int J Mol Sci.* Volume 16(4), pp 8337–8350.
- Zeltins A. (2013) Construction and Characterization of Virus-Like Particles: A Review. *Mol Biotechnol.* Volume 53(1), pp 92–107.
- Zhang Y., Dong Y., Zhou J., Li X., & Wang F. (2018). Application of Plant Viruses as a Biotemplate for Nanomaterial Fabrication. *Molecules (Basel, Switzerland).* Volume 23(9), pp 2311.
- Zlotnick A, Johnson JM, Wingfield PW, Stahl SJ, Endres D. (1999) A theoretical model successfully identifies features of hepatitis B virus capsid assembly. *Biochemistry.* Volume 38, pp 14644–14652.
- Zlotnick A, Aldrich R, Johnson JM, Ceres P, Young MJ. (2000) Mechanism of capsid assembly for an icosahedral plant virus. *Virology.* Volume 277, pp 450–456.