



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

### EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE CÁPSIDE DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL BROMO EN *E. COLI* Y SU ENSAMBLE EN PARTÍCULAS TIPO VIRUS.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
Lourdes Mendoza Lara

TUTOR PRINCIPAL

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Lilian González Segura  
[Facultad de Química, UNAM](#)

Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros  
[Instituto de Química, UNAM](#)

Ciudad de México. Junio, 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **Jurado asignado**

PRESIDENTE	Costas Basín Miguel Antonio.
VOCAL	García Hernández Enrique.
VOCAL	Hernández García Armando.
VOCAL	Vázquez Duhalt Rafael.
SECRETARIO	Rodríguez Romero Adela.

Este trabajo fue realizado 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, con número 761313.

## **Agradecimientos.**

A mi tutor principal, el Dr. Ismael Bustos Jaimes, por la confianza para permitirme realizar este proyecto, al igual que su asesoría, apoyo y dedicación.

A mi comité asignado, la Dra. Lilian González Segura y el Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros, por su tiempo y consejos a lo largo de este trabajo.

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

A la Dra. Georgina Garza Ramos Martínez y el Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco del LFQIP por todas sus contribuciones para mejorar el contenido experimental.

A mí jurado, el Dr. Miguel Antonio Costas Basín, Dr. Enrique García Hernández, Dr. Armando Hernández García, Dr. Vázquez Duhalt Rafael, Dra. Rodríguez Romero Adela por su tiempo y comentarios para mejorar el contenido de esta tesis.

A la M. en C. Josefina Valadez García por su dedicación en la obtención de las imágenes por AFM, al igual que al Instituto de investigaciones en materiales por prestarnos las instalaciones para obtener las imágenes por TEM para este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio: Ignacio, Lolita, Carlos, Hugo, Iris, Willy, Javier, Eduardo, Sac, Maribel, Esteban y demás compañeros del LFQIP, por todo su apoyo y sugerencias durante mi estancia en el laboratorio y, sobre todo, gracias por su gran amistad.

A mis padres y hermanas por siempre estar a mi lado con todo su amor incondicional. Siempre serán parte fundamental de mi vida y de todos mis logros.

# Índice

<b>RESUMEN</b> .....	6
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	7
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	8
<b>2.1 Nanomedicina</b> .....	8
<b>2.1.1 Partículas tipo virus (VLPs)</b> .....	11
<b>2.1.2 Sistemas de producción de VLPs</b> .....	14
<b>2.1.3 Ensamble de VLPs</b> .....	19
<b>2.2 Virus del mosaico del bromo</b> .....	22
<b>2.2.1 Características Generales</b> .....	22
<b>2.2.2 Estructura de la cápside y su estabilidad</b> .....	24
<b>2.2.3 Usos del BMV</b> .....	27
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	32
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	32
<b>4.1 Objetivo general</b> .....	32
<b>4.2 Objetivos particulares</b> .....	32
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	33
<b>5.1 Metodología general</b> .....	33
<b>5.2 Materiales</b> .....	34
<b>5.3 Metodología</b> .....	36
<b>5.3.1 Transformación bacteriana.</b> .....	36
<b>5.3.2 Sobre-expresión de la proteína de cápside</b> .....	37
<b>5.3.3 Escalamiento del cultivo celular.</b> .....	37
<b>5.3.4 Purificación de CP</b> .....	38
<b>5.3.5 Análisis por Dispersión Dinámica de Luz (DLS)</b> .....	43
<b>5.3.6 Ensayo de estabilidad de VLPs.</b> .....	43
<b>5.3.7 Tinción de proteína en gel de agarosa</b> .....	46
<b>5.3.8 Caracterización estructural de las VLPs</b> .....	47
<b>5.3.9 Condiciones de desensamble</b> .....	48
<b>6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	49
<b>6.1 Células bacterianas transformantes y sobreexpresión de la proteína de cápside (CP) del BMV</b> .....	49

<b>6.2 Purificación de CP</b> .....	51
<b>6.2.1 Lisis celular</b> .....	51
<b>6.2.2 Separación del sistema de chaperonas GroES-GroEL de CP</b> .....	52
<b>6.2.3 Cromatografía de intercambio aniónico</b> .....	54
<b>6.2.4 Ensamble de las proteínas de cápside</b> .....	56
<b>6.2.5 Cromatografía de exclusión molecular</b> .....	57
<b>6.3 Análisis por DLS</b> .....	59
<b>6.4 Ensayo de estabilidad de VLPs</b> .....	60
<b>6.4.1 Cromatografía de exclusión molecular para el ensayo de estabilidad</b> .....	67
<b>6.5 Interacción de ácidos nucleicos de <i>E. coli</i> y proteína de cápside</b> .....	71
<b>6.5.1 Degradación de ácidos nucleicos de <i>E. coli</i></b> .....	72
<b>6.5.2 Cromatografía de intercambio aniónico de muestra tratada con benzonasa</b> .....	73
<b>6.5.3 Cromatografía de exclusión molecular de muestra tratada con benzonasa</b> .....	75
<b>6.5.4 Análisis por DLS</b> .....	76
<b>6.5.5 Tinción de proteína en gel de agarosa</b> .....	76
<b>6.6 Estudio del ensamble de CP en <i>E. coli</i></b> .....	78
<b>6.7 Caracterización estructural de las VLPs</b> .....	82
<b>6.7.1 Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)</b> .....	82
<b>6.7.2 Microscopia de Transmisión Electrónica (TEM)</b> .....	83
<b>6.8 Condiciones de desensamble</b> .....	84
<b>6.8.1 Efecto del pH</b> .....	84
<b>6.8.2 Efecto de agentes caotrópicos</b> .....	87
<b>7 CONCLUSIONES</b> .....	91
<b>8 PERSPECTIVAS</b> .....	93
<b>REFERENCIAS</b> .....	94

## RESUMEN

Las partículas tipo virus (VLPs) son nanopartículas formadas a partir de la proteína estructural de la cápside viral y, a diferencia de los virus, no contienen material genético. Las VLPs se pueden obtener a través de organismos unicelulares como bacterias, levaduras y líneas celulares de mamíferos e insectos. También se obtienen de manera nativa, a partir de virus que infectan plantas, de los cuales se extraen y posteriormente se elimina su material genético sin comprometer la integridad de las proteínas de cápside, para obtener las nanopartículas vacías o VLPs. Sin embargo, el uso de sistemas bacterianos representa también una excelente alternativa para la producción de VLPs debido a características como rápida producción, bajo costo y fácil escalamiento. Además, presentan la posibilidad de sobreexpresar proteínas con modificaciones genéticas para desarrollar VLPs con aplicaciones más específicas.

En este trabajo, se obtuvieron VLPs mediante la expresión heteróloga en *E. coli* de la proteína de cápside (CP) del Virus del Mosaico del Bromo (BMV). Debido a que el único método reportado para la producción de estas VLPs es a partir de plantas infectadas, se evaluó la producción de CP en la cepa de *E. coli* BL21pGro7, la cual sobreexpresa un complejo de chaperonas, GroEL-GroES, que permitieron la sobreexpresión de CP. La proteína se obtuvo en forma soluble y fue purificada exitosamente mediante cromatografías de intercambio aniónico y exclusión molecular. Las VLPs ensambladas presentaron un diámetro hidrodinámico de aproximadamente 30 nm en una población monodispersa, resultado coincidente con el análisis mediante microscopias de fuerza atómica y de transmisión electrónica, encontrando estructuras esféricas con un diámetro entre 27 y 29 nm.

Las VLPs recombinantes también presentaron alta estabilidad frente a cambios de pH (4.8-8.4), fuerza iónica (0.1-1 M), y en presencia o ausencia de iones  $Mg^{2+}$ . Dicha estabilidad se explicó por la presencia de ácidos nucleicos de *E. coli* en la cavidad de las VLPs. Dado lo anterior, es posible que el ensamble de CP en estructuras icosaédricas se lleve a cabo *in vivo* en *E. coli*.

# 1. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es representada como un camino para el estudio, diseño, desarrollo, caracterización, manipulación y aplicación de cualquier material a escala nanométrica (1-100 nm) que, además, posee diversas propiedades potencialmente útiles para mejorar las condiciones de vida. Las propiedades de estos nuevos nanomateriales tienen potencial en muchos campos, especialmente en energía, electrónica, alimentación, agricultura, cosmética y salud.

En la medicina, el desarrollo de la nanotecnología ha proporcionado estructuras diseñadas a partir de biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y carbohidratos, denominadas "nanovehículos" o "nanoacarreadores". Tal es el caso de los liposomas, micelas, nanopartículas poliméricas y partículas tipo virus, por mencionar algunos. Estos nanovehículos se han propuesto como herramientas en la prevención, diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades, presentando mejoras en los sistemas de administración de medicamentos, reduciendo efectos secundarios y dosis. También se han aumentado las posibilidades de diagnóstico con el uso de nanopartículas para imágenes médicas, mejorando la eficiencia con tratamientos sitio-específicos. Sin embargo, estas plataformas para la mayoría de sus aplicaciones se encuentran en investigación, optimizando su especificidad, biocompatibilidad, farmacocinética, toxicidad e inmunogenicidad.

Debido a la alta funcionalidad que pueden proporcionar los nanoacarreadores en diferentes campos de la medicina, en este proyecto nos propusimos estudiar la producción de partículas tipo virus (VLPs) formadas a partir de la proteína de cápside (CP) del virus de planta llamado virus de mosaico del bromo (BMV). Este virus presenta características útiles para su aplicación en humanos, como su biodegradabilidad, biocompatibilidad y capacidad de internalización celular. Propusimos obtener la CP a partir de su expresión heteróloga en *E. coli*, método que proporcionará en un futuro utilidades para la ingeniería de esta partícula proteica.

## 2. ANTECEDENTES

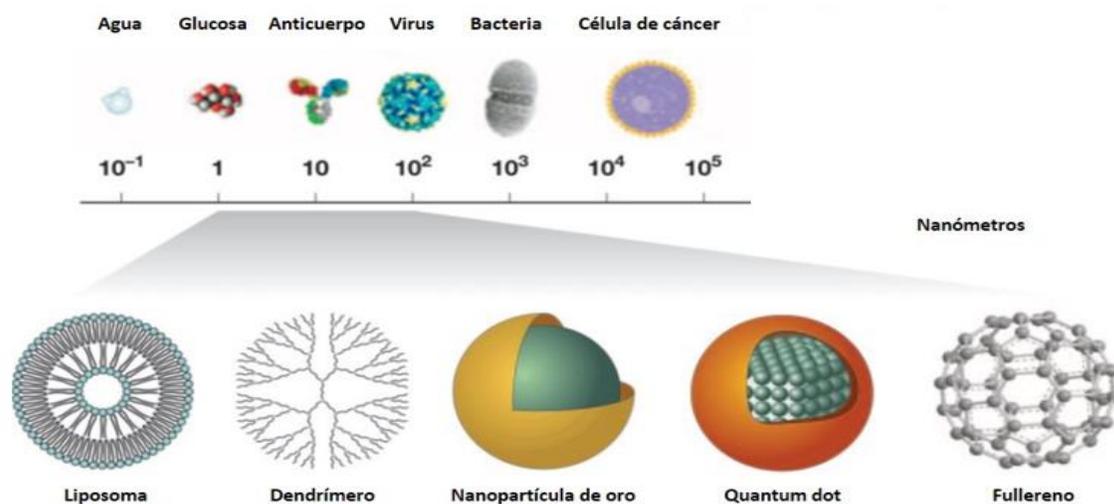
### 2.1 Nanomedicina

Dentro de los avances en la nanotecnología se han logrado desarrollar una amplia gama de áreas multidisciplinarias, entre ellas la nanomedicina, que es considerada como una de las principales innovaciones en salud y medicina. Esta área principalmente aplica conocimientos tanto de la ciencia, como de la tecnología, incluyendo física, química, ingeniería, biología y medicina (Nasrollahzadeh et al., 2019) con el fin de crear sistemas a escala nanométrica (1-100 nm) a base de biomoléculas como: proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, o materiales inorgánicos (Nikalje, 2015). Estos nuevos materiales pueden servir de "nanovehículos" o "nanoacarreadores", ya que, de manera general, son una plataforma diseñada para cargar, proteger y transportar fármacos, proteínas, polipéptidos, genes o ácidos nucleicos, dentro del cuerpo humano para entregarlos en células específicas (Zhang et al., 2020).

Cada uno de estos nanovehículos es clasificado en función del principal material utilizado en su formulación, como es el caso de moléculas anfipáticas, proteínas y materiales inorgánicos (Figura 1) (Zhang et al., 2020). Uno de los nanoacarreadores más estudiados son los liposomas, descritos por primera vez por Bangham et al., en 1965 como un sistema coloidal formado por el autoensamble de lípidos anfifílicos formando vesículas esféricas con una bicapa lipídica y con un núcleo vacío e hidrofílico. De manera similar, se encuentran las micelas, estructuras esféricas formadas por una sola capa lipídica, que contienen un núcleo hidrofóbico con una superficie hidrofílica. Ambos nanocompartimentos son capaces de transportar y entregar tanto agentes terapéuticos hidrofílicos como hidrofóbicos (Simonazzi, 2018).

Las nanopartículas basadas en proteínas son consideradas como sistemas biocompatibles, biodegradables, con baja toxicidad e inmunogenicidad. Estas plataformas pueden estar formadas por una variedad de proteínas, incluyendo

albúmina, colágeno, ferritina y algunas proteínas estructurales de virus, como es el caso de las partículas tipo virus (VLPs, Virus-Like Particles) (MaHam et al., 2009). Otro tipo de nanopartículas son los fulerenos, hechos a partir de carbono, formando estructuras esféricas, elipsoides y tubulares, con un centro vacío. Los dendrímeros son macromoléculas poliméricas y ramificadas, que adoptan su morfología esférica cuando se extienden (Szefler, 2018). Finalmente, las nanopartículas formadas de materiales inorgánicos, incluyendo semiconductores, metales, óxidos de metal, que poseen variedad en tamaño, forma y su composición química es ajustable, presentando su mayor aplicación biomédica en imágenes y terapéutica (Kunjachan et al., 2015).



**Figura 1.** Escala nanométrica. Ilustración de algunos ejemplos de materiales diseñados en nanotecnología como liposoma, dendrímero, nanopartícula de oro, quantum dot, fullerenos (Nikalje, 2015).

Los nanoacarreadores anteriormente mencionados son de gran importancia en la nanomedicina, ya que presentan ventajas en comparación con los vehículos de entrega tradicionales. Entre sus características se encuentra la amplia relación entre superficie y volumen de las nanopartículas, dado que les permite aumentar la capacidad de carga de agentes terapéuticos o reactivos de imagen que, además, al mantenerse encapsulados en la mayoría de las nanopartículas, son protegidos de la eliminación prematura, la degradación enzimática o la exposición a condiciones

fisiológicas nocivas para las moléculas cargo (Saxena et al., 2020). Además, la superficie de las nanopartículas puede ser decorada con ligandos específicos o anticuerpos, proporcionando control para el direccionamiento y la liberación de su carga en células particulares. Esta última característica, representa un gran avance en la focalización, ya que se espera aumentar la eficiencia del agente terapéutico y, además, reducir los efectos secundarios que son causados por la inespecificidad en la entrega, especialmente cuando son tratamientos para atacar células cancerosas, los cuales también son capaces de dañar células sanas (Bar-Zeev et al., 2017). Otra ventaja importante de los nanovehículos es su tamaño a nanoescala, que les proporciona un mayor efecto de permeabilidad y retención, permitiendo la entrada en áreas inaccesibles, como tejidos inflamados, células cancerosas y en algunos casos, las nanopartículas son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (Wu et al., 2019).

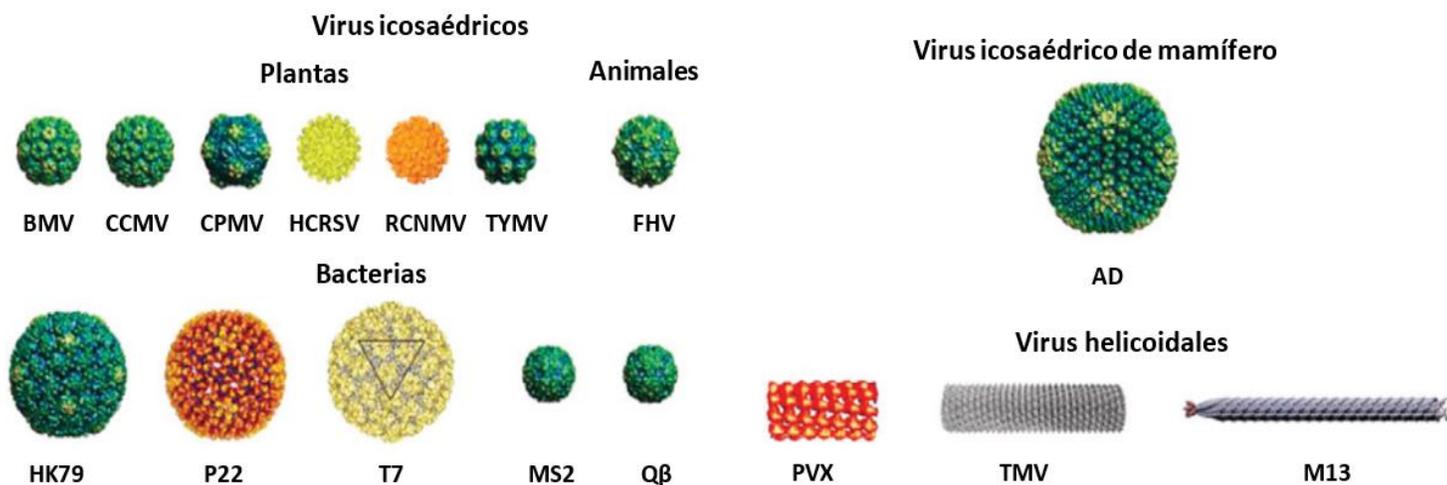
Dadas las importantes características que presentan estas nanopartículas en la medicina, su aplicación se ha enfocado principalmente en la administración de fármacos dirigidos y quimioterapia para el tratamiento de cáncer y otras enfermedades (Simonazzi, 2018), ejemplos de ellos es el fármaco doxorubicina liposomal PEGilada (Doxil/caelyx) y el paclitaxel unido a albúmina (Abrax-ane), ambos sistemas para tratamiento de cáncer y aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, Food and Drug Administration) (Wagner et al., 2006). También se han utilizado para la entrega de agentes de contraste para obtener imágenes ópticas por resonancia magnética o tomografías; ya que las imágenes permiten proporcionar diagnósticos tempranos. Además, al usarse en la localización y progresión de enfermedades, se espera que puedan mejorar los tratamientos o la prevención tumores (Kunjachan et al., 2015), como es el caso del ferucarbotran (Resovist), el cual es un agente de contraste que consiste en micropartículas de óxido de hierro recubiertas con carboxidextrano, principalmente utilizado para imágenes de resonancia magnética de tumores hepáticos (Wagner et al., 2006).

Entre otras aplicaciones se encuentra la ingeniería tisular, la cual se encarga de dirigir el crecimiento, alineación y diferenciación celular para regular las células en la reparación o el reemplazo de tejido dañado. También se encuentra la terapia génica: en la entrega de DNA, pequeños RNA y maquinaria para la edición del genoma (Keles et al., 2016); terapia fototérmica y terapia fotodinámica (Zhang et al., 2003).

### **2.1.1 Partículas tipo virus (VLPs)**

Entre las nanopartículas o nanovehículos anteriormente mencionados como sistemas de entrega en la nanomedicina, se encuentran las VLPs. Estas plataformas son derivadas de virus, por lo que su componente principal es una o más proteínas estructurales o de cápside, formando una estructura definida a partir del autoensamble de estas proteínas en una conformación icosaédrica o helicoidal, mayoritariamente reproduciendo tanto la forma como el tamaño (de 20 hasta más de 200 nm) de la cápside del tipo de virus procedente (Steele et al., 2017). Las VLPs pueden ser obtenidas a partir de virus que infectan células de plantas como el Virus del moteado clorótico del caupí (CCMV), de animales como los adenovirus, o bacterias, como es el caso del bacteriófago icosaédrico HK79 y el helicoidal M13 (Figura 2) (Yildiz & Steinmetz, 2011).

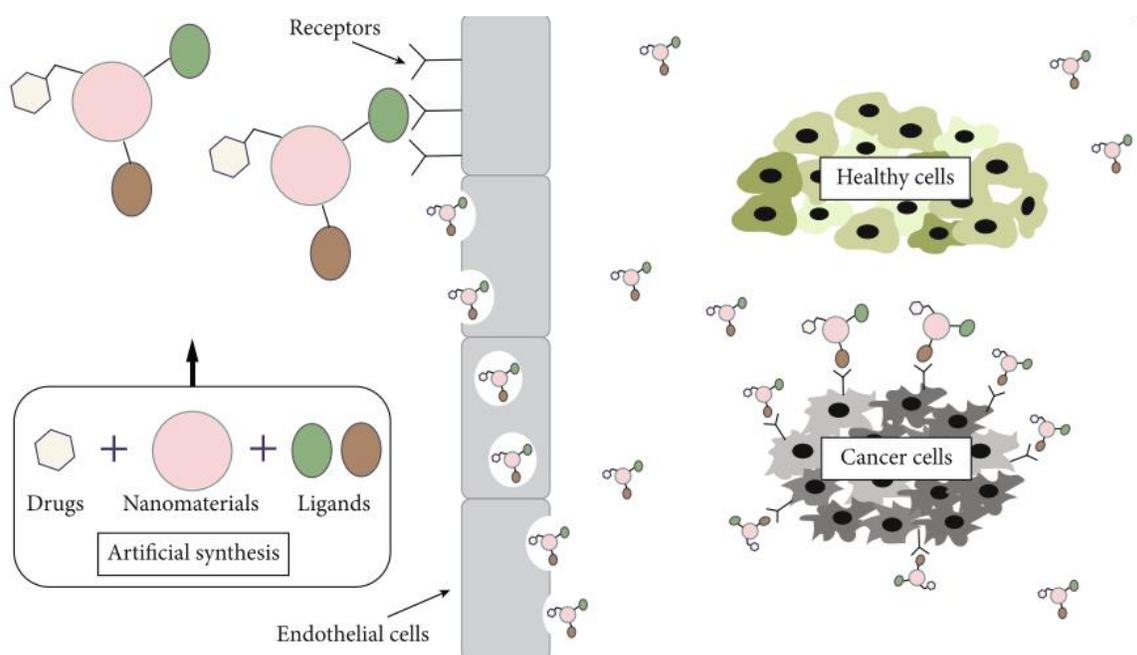
La diferencia principal entre un virus y las VLPs, radica en la carencia de material genético en las VLPs, por lo que no tienen capacidad de infectar células huésped ni de replicarse al no contener material genético. Además, les permite tener un espacio vacío en la parte interna de la cápside, presentando una característica significativa que coloca a las VLPs como una opción de entrega de agentes terapéuticos en la nanomedicina (Venkataraman, 2020).



**Figura 2.** Representaciones estructurales de virus estudiados como plataformas para la nanotecnología. Virus del mosaico del bromo (**BMV**), Virus del moteado clorótico del caupí (**CCMV**), Virus del mosaico del caupí (**CPMV**), Virus de la mancha anular clorótica del hibisco (**HCRSV**), Virus del mosaico necrótico del trébol rojo (**RCNMV**), Virus del mosaico amarillo de nabo (**TYMV**), Adenovirus (**AD**), Bacteriófagos icosaédricos **HK79**, **MS2**, **Q $\beta$** , cabeza de los bacteriófagos **P22** y **T7**, Virus X de la papa (**PVX**), Virus del mosaico del tabaco (**TMV**), Bacteriófago helicoidal **M13** (Yildiz & Steinmetz, 2011).

Estas nanopartículas poseen características importantes, como la amplia variedad en cuanto a tamaño, forma y célula hospedera. Esto último las hace estructural y funcionalmente atractivas, además de su innata capacidad para proteger, transportar y entregar eficientemente su material genético a células huésped específicas (Van Kan-Davelaar et al., 2014). Aunado a esto, la biocompatibilidad y biodegradabilidad de las VLPs las hace aptas para su uso o aplicación en células humanas y de otros animales. También, las VLPs son estructuras altamente monodispersas en tamaño; estables a diferentes condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica; su cavidad vacía puede ser ocupada para encapsular moléculas para diversas aplicaciones, desde entrega de fármacos, vacunas, terapia génica y obtención de imágenes ópticas (Vazquez-Duhalt, 2020). Algunas VLPs presentan la capacidad de internalización celular sin causar toxicidad. Tal es el caso de las VLPs que muestran su tropismo natural hacia un tejido particular, característica dada por el virus del cual se originaron. Por ejemplo, debido a que el virus de la hepatitis B (VHB) infecta naturalmente al hígado, las VLPs derivada del VHB pueden internalizarse en células hepáticas (Shlomai et al., 2009).

Una de las funcionalidades que se espera obtener de los nanovehículos, es la capacidad de entrega dirigida para mejorar la focalización en células dañadas y no en células sanas (Figura 3). Para ello, las VLPs presentan en su cápside, interfaces disponibles para ser genética o químicamente manipuladas, como la superficie externa que se localiza expuesta al disolvente, la superficie interna y la interfase entre las proteínas (Vazquez-Duhalt, 2020). La superficie externa tiene una gran cantidad y diversidad de aminoácidos con estructuras reactivas, como los residuos de lisina, cisteínas, tirosina, ácido glutámico y ácido aspártico, que permiten la interacción con una amplia gama de ligandos (Wen & Steinmetz, 2016).



**Figura 3.** Representación de un sistema de entrega dirigida. Nanopartícula con múltiples ligandos para pasar a través de las células endoteliales y entregar el fármaco solo en células cancerosas (Wang et al., 2020).

Se ha encontrado que la mayoría de las VLPs poseen las propiedades necesarias para la conjugación química, como es el caso del CCMV, en el cual Barwa et al. en el 2016, realizaron conjugaciones químicas con múltiples ligandos: colorantes fluorescentes para visualización (éster de succinimidil-carboxifluoresceína y Alexa fluor 610), una molécula para mejorar la focalización (ácido fólico) y un fármaco contra el cáncer (doxorrubicina), utilizando como células objetivo la línea celular MCF7 (carcinoma mamario humano). Además, la cavidad

de las VLPs de CCMV se ocuparon con nanopartículas de oro conjugadas con doxorubicina para mejorar la estabilidad y la carga fármaco. Otros virus como el CPMV, y bacteriófagos como Q $\beta$  y AP205, han sido validados para la conjugación con diferentes antígenos, moléculas de bajo peso molecular y proteínas enteras (Wen & Steinmetz, 2016).

Los usos de las VLPs se han desarrollado ampliamente, tanto por su capacidad de exhibir en la superficie péptidos, proteínas y otros materiales biológicos, como de encapsular ácidos nucleicos, proteínas, polímeros, y pequeñas moléculas orgánicas e inorgánicas (Yildiz & Steinmetz, 2011). Entre los usos más destacables se encuentran su uso como vacunas, en la administración de medicamentos o agentes de contraste. Esto último, permite la inmovilización de los agentes fluorescentes en las VLPs permitiendo una carga elevada y específica, evitando agregación o desactivación de los compuestos fluorescentes, lo que proporciona un beneficio para la obtención de imágenes médicas (*in vivo*) para el diagnóstico y evaluación de tratamientos terapéuticos (Wu et al., 2013).

Otro uso importante de las VLPs es la terapia génica, debido a su natural capacidad de unión a ácidos nucleicos, como la administración sistémica del miR-146a a través de VLPs del bacteriófago MS2, que presentó como resultado un tratamiento eficaz en la reducción de la expresión de anticuerpos y los niveles de citoquinas inflamatorias en ratones propensos a lupus eritematoso sistémico (Pan et al., 2012)

### **2.1.2 Sistemas de producción de VLPs**

El proceso de producción de VLPs de manera genérica consta principalmente de tres secciones: producción, purificación y formulación. En el paso de producción, se clonan los genes estructurales virales de interés, con el objetivo de sobreexpresar estas proteínas necesarias para la formación de la cápside viral a través de sistemas de expresión conformados por un organismo

hospedero procariota (bacterias) o eucariota (levaduras, células de insectos, mamíferos y plantas), y un vector de expresión que posee los elementos génicos necesarios para realizar los procesos de transcripción y traducción (Venkataraman, 2020). Al obtener la expresión de la proteína, las células hospederas se cosechan, lisan y clarifican, para asegurar la eliminación de residuos de células contaminantes. Posteriormente, la elaboración de las VLPs purificadas, está acompañada por pasos de cromatografía, como afinidad, intercambio aniónico, exclusión molecular o pasos de ultracentrifugación. Finalmente, las proteínas de cápside obtenidas se ensamblan o desensamblan para eliminar los ácidos residuales de la célula huésped, esto dependiendo del estado en el que se encuentre el producto purificado (Vicente et al., 2011).

Una de las etapas importantes de la producción de las proteínas estructurales, es la elección del organismo hospedero, ya que se realiza de acuerdo con las propiedades químicas y biológicas de la proteína recombinante. Se pueden utilizar sistemas de expresión procariota o eucariota para proteínas que requieran modificaciones postraduccionales (Zeltins, 2013). Los sistemas más utilizados son:

- Baculovirus/células de insecto: es un sistema de expresión para la producción de VLPs formadas por repeticiones de una subunidad de proteína de cápside (virus no envueltos) y para aquellas formadas por diferentes proteínas (virus envueltos). Presentan características como un alto rendimiento de proteínas recombinantes en comparación con las obtenidas en bacterias y levadura. También, son capaces de llevar a cabo vías complejas de modificaciones postraduccionales. Las líneas celulares de insecto ampliamente utilizadas derivan de *Spodoptera frugiperda* (Sf9/Sf21) y *Trichoplusia ni* (Tn5) (Vicente et al., 2011).
- Células de mamífero y aves: son sistemas de expresión para la producción de múltiples proteínas estructurales, por lo tanto, pueden ser utilizadas para la obtención de VLPs envueltos y no envueltos. De igual manera que las

células de insecto, estos sistemas son altamente eficientes en modificaciones postraduccionales, mejorando el plegamiento de proteínas. Existe una amplia gama de líneas celulares, algunos ejemplos son las células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón de hámster (BHK-21) y células embrionarias de riñón humano 293 (HEK293). Sin embargo, presentan ciertas desventajas, como bajos rendimientos de producción y la posibilidad de transmisión de patógenos (Fuenmayor et al. 2017).

- **Levaduras:** utilizadas especialmente para la expresión de proteínas recombinantes aplicando sistemas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*. Estos sistemas presentan ventajas como crecimiento celular rápido, alto rendimiento de expresión de proteínas heterólogas, fácil escalamiento y las proteínas pueden presentar algunas modificaciones postraduccionales (Dai et al., 2018).
- **Bacterias:** es uno de los sistemas más utilizados para la expresión de una amplia gama de proteínas recombinantes, al igual que muchos tipos de VLPs, especialmente para VLPs de virus no envueltos. La expresión se lleva a cabo principalmente en *Escherichia coli* (*E. coli*), que representa una opción de sistema eficiente debido a características como crecimiento rápido, cultivos de bajo costo con altas densidades celulares, fácil escalamiento, amplia variedad de vectores de expresión y cepas mutantes para aumentar la producción de proteínas. Aunque, al igual que otros sistemas de expresión, presenta desventajas como la ineficiente secreción de proteínas al medio de cultivo, la formación de cuerpos de inclusión insolubles en el citoplasma celular y pocas modificaciones postraduccionales (Rosano & Ceccarelli, 2014).

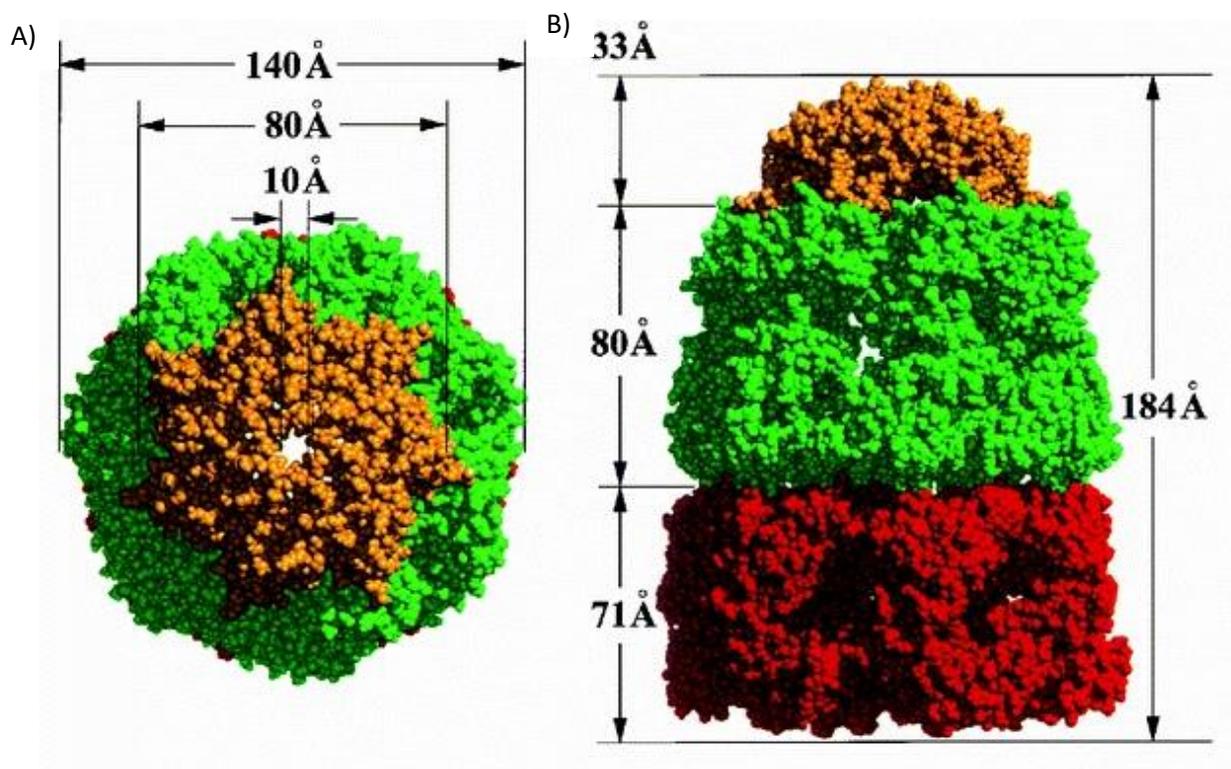
Las VLPs también se logran obtener a partir de los viriones nativos, los cuales pueden ser producidos en niveles altos en huéspedes naturales, tal es el caso de los virus de plantas, como el virus del mosaico del bromo (BMV), el CCMV, el virus del mosaico del tabaco (TMV), que se pueden obtener en cantidades de gramos en

plantas infectadas por dichos virus. Estos viriones obtenidos se desensamblan bajo condiciones fisicoquímicas específicas, seguido de un proceso de hidrólisis alcalina de los ácidos nucleicos liberados. Finalmente, las proteínas de cápside libre de ácidos nucleicos son reensamblados en VLPs con morfología y tamaño característico (Ochoa et al., 2006). Sin embargo, las VLPs quiméricas, con mutaciones para diversas aplicaciones de entrega dirigida, a menudo son producidas en sistemas de expresión heteróloga como *E. coli* o en levaduras.

La variedad de cepas de *E. coli* para la expresión de proteínas es amplia, muchas de ellas son especializadas. Comúnmente, las cepas utilizadas son BL21(DE3) y algunas derivadas del linaje de K-12 (Daegelen et al., 2009). Entre las peculiaridades de la cepa BL21 se encuentra la deficiencia de las proteasas Lon y OmpT, que reducen considerablemente la degradación de la proteína recombinante dentro de la bacteria (Grodberg & Dunn, 1988). Además de la inserción del profago  $\lambda$ DE3 en su cromosoma, donde se adicionó el gen de la RNA polimerasa T7 bajo el control transcripcional del promotor lacUV5, que puede ser inducido por lactosa o su análogo no hidrolizable isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Studier & Moffatt, 1986). La expresión basal puede ser controlada con la expresión de la lisozima T7 que es proporcionada a la bacteria por un plásmido compatible dando como resultado una cepa llamada BL21(DE3)pLysS (Dubendorf & Studier 1991).

Otro tipo de sistema utilizado para la expresión heteróloga de proteínas es la cepa BL21 transformada con plásmidos que contienen sistemas de chaperonas. Tal es el caso del plásmido pGro7 con las chaperonas GroEL-GroES, el cual contiene un promotor araB, por lo que la expresión de las chaperonas es inducida por L-arabinosa a una concentración final de 0.5 - 4 mg/mL, además cuenta con un marcador de resistencia a cloranfenicol. Este sistema de chaperonas, GroEL y su co-chaperona GroES, son una de las proteínas más estudiadas y abundantes en bacterias. Su función principal radica en ayudar y acelerar el plegamiento de las proteínas presentes en la célula al interactuar con ellas transitoriamente o no-covalentemente, además de requerir ATP para desempeñar su función (Deuerling & Bukau, 2004).

La estructura tridimensional (PDB 1AON) del complejo GroEL-GroES proporcionada por Xu et al. en 1997, indica que GroEL está compuesta por 14 subunidades idénticas, cada una ellas con una masa molecular de 57 kDa. Sus subunidades interaccionan y se ensamblan como dos anillos heptaméricos apilados, dejando una cavidad interna para la unión de las proteínas no nativas, con un diámetro de aproximadamente 45 Å. Mientras que GroES está formada por 7 subunidades idénticas con una masa molecular de 10 kDa, que de igual manera que GroEL, se ensamblan en anillos heptaméricos (Figura 4). La interacción entre los dominios de GroEL y GroEs, se lleva a cabo con la presencia de  $Mg^{2+}$ -ATP o  $Mg^{2+}$ -ADP, formando compartimentos con paredes hidrofílicas que aumentan el correcto plegamiento de proteínas con un tamaño de hasta 70 kDa y posteriormente su liberación. En este trabajo empleamos la cepa de *E. coli* BL21(DE3)pGro7.



**Figura 4.** Estructura del complejo de GroEL-GroES con sus respectivas dimensiones. A) Vista superior y hacia debajo de la unión de GroES (naranja) con uno de los heptámeros de GroEL (verde). B) Vista lateral del complejo de chaperonas representando en rojo un heptámero de GroEL (Xu et al., 1997)

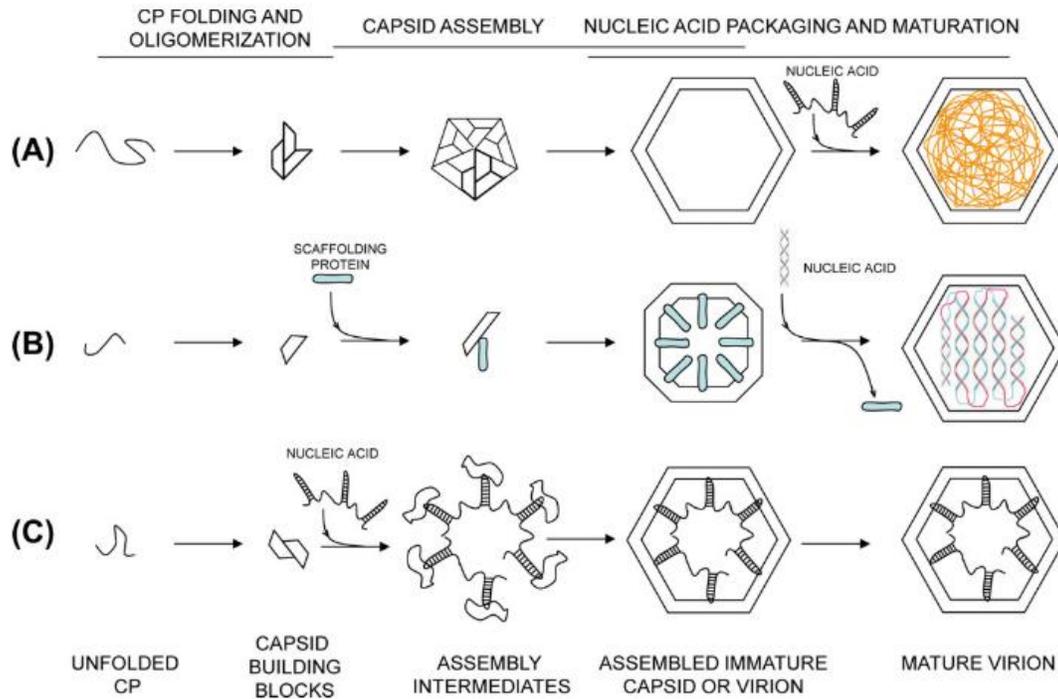
### 2.1.3 Ensamble de VLPs

Un proceso importante para la obtención y uso de VLPs, adicional a su producción en sistemas de expresión, es el mecanismo de ensamble y desensamble de las cápsides, ya que es considerado como una alternativa para el encapsulamiento y liberación de agentes terapéuticos. Principalmente, la capacidad de organización de las proteínas de cápside en presencia de proteínas, enzimas, lípidos, ácidos nucleicos y moléculas orgánicas, formando estructuras definidas y características de los virus (Chaudhary & Yadav, 2019). Además, el entendimiento del proceso de ensamble de los virus, de igual manera, es empleada para la modificación de VLPs mediante ingeniería de proteínas para el desarrollo de nanovehículos más especializados en aplicaciones en la entrega sito-dirigidas (Dedeo et al., 2011)

Este proceso de ensamble de cápsides virales se puede definir como una oligomerización compleja, regulada por interacciones ordenadas entre las subunidades de proteínas y una serie de intermediarios, que generalmente son estructuras transitorias. Universalmente se reconocen tres mecanismos para el ensamble de las cápsides (Figura 5): aquella en la cual solo se requiere la participación de la proteína formadora de la cápside en condiciones establecidas; el mecanismo en el que requiere además de la proteína de cápside, otra u otras proteínas andamio y finalmente, el ensamble que se lleva a cabo a través de la interacción entre ácidos nucleicos y las subunidades de las proteínas de cápside (Mateu, 2013).

En conjunto, este proceso incluye una amplia complejidad estructural, aun en las cápsides icosaédricas más sencillas, las cuales se encuentran formadas por una sola proteína de cápside. En este caso, las cápsides están constituidas por decenas o cientos de copias de la misma proteína, que son capaces de adoptar diversas conformaciones ligeramente diferentes en la cápside, pero siempre manteniendo su integridad. Algunas de estas conformaciones se encuentran formando pentámeros

y otras de ellas forman hexámeros, sin mantenerse necesariamente en oligómeros aislados ni estables (Perlmutter & Hagan, 2015).



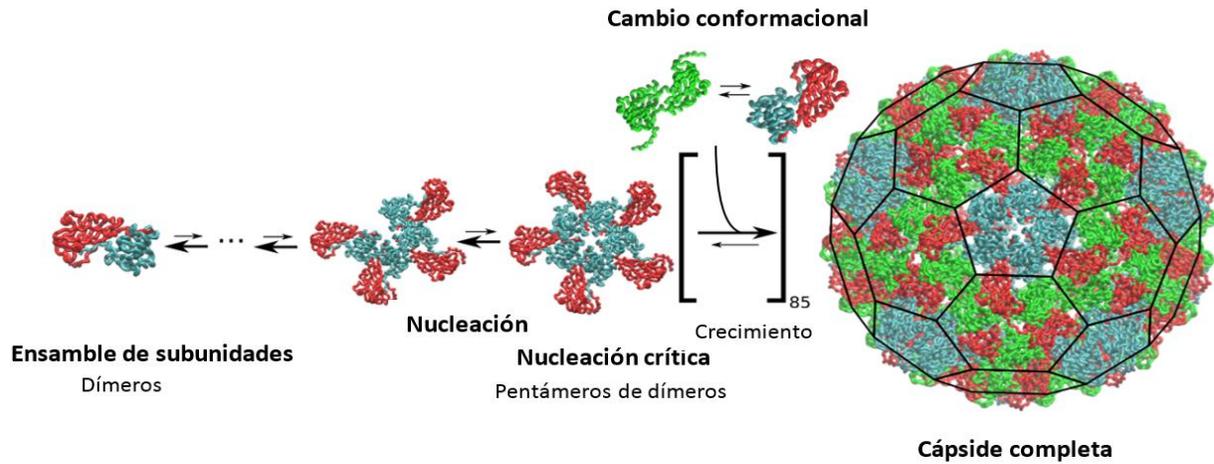
**Figura 5.** Mecanismo de ensamble de cápsides. A) Ensamble a partir de las subunidades proteicas B) Ensamble asistido por proteínas andamio C) Ensamble formado por la interacción entre las subunidades proteicas y los ácidos nucleicos del virus (Mateu, 2013).

Además de la conformación de las subunidades de proteínas, la composición en cuanto a proporción de aminoácidos polares, aromáticos e hidrofóbicos, representan un papel de gran importancia, ya que dan lugar a la formación de secciones importantes para el ensamble. Tal es el caso de los segmentos cortos del N-terminal y C-terminal de la proteína que, en la mayoría de las cápsides, representan secciones ordenadas y desordenadas que pueden contener dominios ricos en arginina y lisina, que proporcionan cargas positivas, aumentando su interacción con ácidos nucleicos y permitiendo el ensamble o la estabilidad de la cápside (Beren et al., 2020; Speir et al., 1995). Asimismo, los aminoácidos formadores de cápside también son capaces de proporcionar regiones que den lugar al contacto entre las subunidades de la proteína de cápside a través de

interacciones hidrofóbicas, electrostáticas, de van der Waals, y enlaces de hidrógeno, asegurando la formación de partículas cerradas (Chaudhary & Yadav, 2019).

De manera general, el ensamble de virus icosaédricos se desarrolla en tres etapas generales: una fase inicial lenta, durante la cual se crean intermediarios estables de la cápside como dímeros de subunidades de proteínas. Posteriormente se lleva a cabo el proceso llamado nucleación, donde se forman pentámeros por la unión de dímeros, y finalmente una etapa de crecimiento, determinada por la adición de subunidades libres hasta la construcción de VLPs uniformes (Figura 6) (Perlmutter & Hagan, 2015). El mecanismo de nucleación y crecimiento es favorecido por interacciones fuertes proteína-proteína, típicamente a pH bajo y a una concentración específica de proteína. Esta propiedad fisicoquímica es importante en el control y dirección del proceso de ensamble, ya que, en algunos casos, es el cambio de pH el que proporciona interacciones electrostáticas entre las cargas de las proteínas, dando lugar a un ensamble completo (Habibi et al., 2016).

Las condiciones de ensamble y desensamble pueden variar de un tipo de virus a otro. Generalmente se utilizan sistemas de amortiguadores para llevar a cabo este proceso *in vitro*. En algunos casos, los sistemas están conformados por fuerza iónica alta o baja, agentes reductores, iones divalentes, agentes quelantes, aditivos como glicerol o L-arginina y otros agentes químicos a pH ácido o básico y cierta temperatura. (Perlmutter & Hagan, 2015). Tal es el caso del CCMV, el cual es capaz de ensamblarse *in vitro* a partir de un sistema compuesto por un pH ácido, alrededor de 4-5, en presencia de iones  $Mg^{+2}$  y fuerza iónica alta y baja. Estas cápsides también se pueden desensamblar hasta sus subunidades proteicas, en condiciones de pH neutro (Lavelle et al., 2007). El Poliomavirus, se puede ensamblar en un ambiente con baja fuerza iónica, en presencia de glicerol como aditivo en un pH neutro, 7.4 (Gleiter & Lilie, 2001).



**Figura 6.** Esquema del mecanismo de ensamblaje para el Virus del moteado clorótico del caupí (CCMV) (Perlmutter & Hagan, 2015).

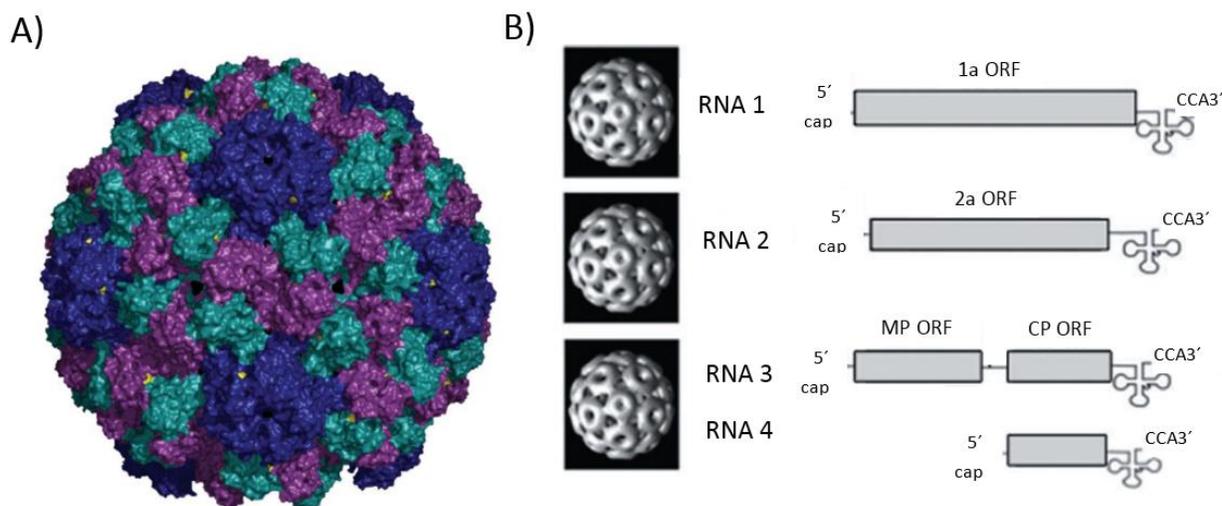
## 2.2 Virus del mosaico del bromo

### 2.2.1 Características Generales

Recientemente ha crecido el interés por el desarrollo de VLPs a partir de virus de plantas para su uso en áreas como nanomedicina. Especialmente por características como la simplicidad de la estructura, en las cuales, la cápside está formada por una o dos proteínas, sin una capa lipídica o membranas. Además, es fácil de, la plasticidad de la cápside le permite expandir su tamaño (hinchamiento), su capacidad de ensamblaje y desensamblaje, y no son un peligro biológico, ya que no son infecciosos para células de animales y humanos. Finalmente, los virus de plantas son estructuras altamente estables en diversas condiciones de temperatura, pH, fuerza iónica, presencia de proteasas y en diferentes mezclas orgánicas (Zhang et al., 2018; Alemzadeha et al., 2018).

Entre los virus icosaédricos con mayor área de investigación y aplicación como plataformas de nanovehículos se encuentran algunos virus de plantas, como es el caso del virus moteado clorótico del caupí (CCMV), el virus del mosaico del caupí (CPMV), el virus del mosaico del bromo (BMV) y entre los virus helicoidales es el virus del mosaico del tabaco (TMV) (Hema et al., 2019).

El BMV (Brome mosaic virus) pertenece a la familia *Bromoviridae* y género *Bromovirus*. Este virus infecta plantas de cereales como *Nicotiana benthamiana* y *Hordeum vulgare* (He et al., 2020). El BMV es, al igual que muchos virus que infectan plantas, un virus icosaédrico no envuelto. Por lo que, la cápside se encuentra formada por una sola proteína de cápside (CP) repetida 180 veces, formando pentámeros y hexámeros ordenados en una estructura T=3. Esta organización es la encargada de proteger su material genético, el cual se encuentra compuesto por cuatro moléculas de RNA de una sola hebra positiva: RNA1 (3.2 kb), RNA2 (2.9 kb) RNA3 (2.1 kb) y un subgenómico RNA4 (1 kb) (Figura 7). El RNA1 y RNA2 se encuentran empaquetados en cápsides separadas y ambos son necesarios para la replicación y transcripción del virus, ya que el RNA1 codifica para una proteína con propiedades similares a una helicasa y el RNA2 para una RNA polimerasa. El RNA3 y el subgenómico RNA4, son empaquetados en la misma cápside. RNA3 codifica para una proteína de movimiento requerida para la propagación, y el subgenómico RNA4 codifica para la CP (Ahlquist, 1992). Cada virión de BMV tiene un peso molecular de alrededor de 4.6 MDa y una cápside viral con diámetros exterior e interior de 28 y 18 nm, respectivamente (Bockstahler & Kaesberg, 1962; Strugała, 2017).



**Figura 7.** Composición estructural del Virus del mosaico del bromo (BMV). **A)** La cápside icosaédrica compuesta por 180 subunidades proteicas ordenadas en una configuración T=3. **B)** Organización del material genómico del BMV representado en las tres partículas de BMV que empaquetan cada RNA (RNA1, RNA2, RNA3 y el subgenómico RNA4) junto con el diagrama esquemático de la región codificadora de las proteínas (Kao et al., 2011).

## 2.2.2 Estructura de la cápside y su estabilidad

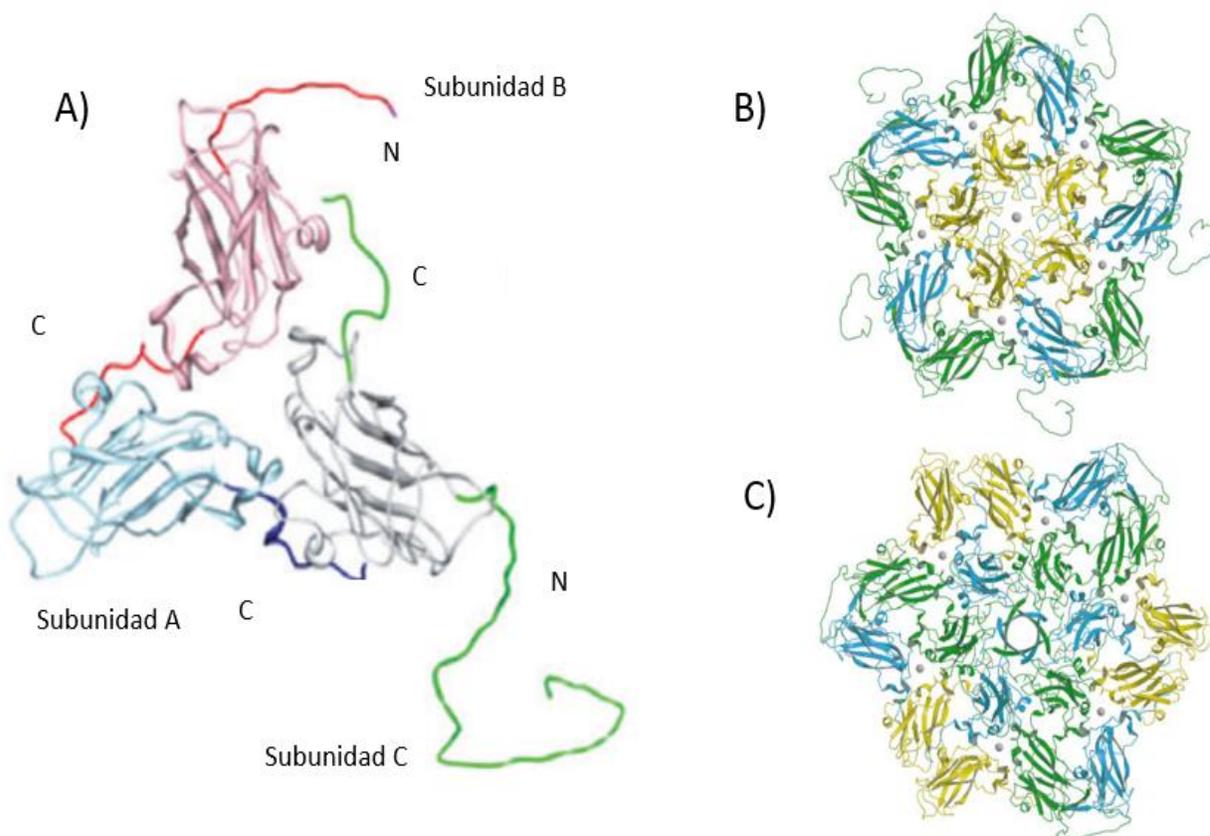
El BMV cuenta con una cápside icosaédrica que se encuentra arreglada en una configuración T=3, de modo que participan 180 subunidades de CP, cada una de ellas compuesta por 189 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 20.3 kDa (Kao et al., 2011). La organización de la cápside implica tres subunidades de CP, subunidad A, B y C, las cuales forman 12 pentámeros a partir de la subunidad A y 20 capsómeros hexaméricos con las subunidades B y C (Figura 8). Estos pentámeros y hexámeros están caracterizados por la presencia de un poro en su centro, cada uno con un diámetro de alrededor de 5 y 6 Å, respectivamente (Lucas et al., 2002).

Entre las funciones importantes de la CP en el BMV, se encuentra su integración como un coordinador en el proceso de la infección viral. Esto incluye desde la participación en el complejo de la replicación hasta suprimir la respuesta inmunitaria innata de las células de plantas hospederas (Kao et al., 2011). Además, las regiones amino- y carboxilo-terminal (N-terminal y C-terminal) de las subunidades de CP también actúan sobre la estabilidad de la cápside del BMV. Principalmente, esta integridad se mantiene por interacciones electrostáticas entre el RNA y el N-terminal de las subunidades proteicas (Pfeiffer et al., 1976). Esto debido a que el N-terminal, compuesto de 26 aminoácidos, contiene un motivo rico en argininas y otros aminoácidos con cargas positivas como la lisina, que se extiende hacia el interior de la cápside, proporcionando una cavidad altamente positiva que interacciona con la carga negativa de los grupos fosfato del material genético (Lucas et al., 2002).

En cápsides vacías, como es el caso de las VLPs, las principales interacciones en el ensamble se forman por la integración de las subunidades proteicas a través del dominio globular de la CP y su región C-terminal (Kao et al., 2011) y aunque son más débiles que las interacciones entre proteína y RNA, son suficientes para mantener la estabilidad de la cápside, que puede, además, aumentar con ayuda de cationes divalentes (Pfeiffer et al., 1976). Un catión

importante es el  $Mg^{2+}$ , el cual es coordinado por los residuos de glutamato, treonina y aspartato de la CP, para mejorar la construcción in vitro del BMV y mejorar su estabilidad (Lucas et al., 2002).

El ensamble de las cápsides de BMV en función del pH y la fuerza iónica se ha estudiado desde 1974 por Pfeiffer & Hirth, encontrando diferentes estados de agregación dependiendo de las condiciones evaluadas y llegando a la conclusión de que los dímeros es la principal unidad constructora de la cápside. Así como las condiciones ideales para la existencia de estos dímeros, las cuales son pH neutro y fuerza iónica  $\geq 0.5$  M (Pfeiffer & Hirth, 1974; Berthet-Colominas, 1987). Al cambiar las condiciones a un pH menor a 5, las unidades constructoras comienzan a polimerizar en estructuras similares a los virus (Pfeiffer & Hirth, 1974).



**Figura 8** Estructura de la proteína de cápside (CP). **A)** Trímero con las subunidades proteicas A, B y C, ilustrando la localización de las regiones N- y C-terminal que forman la cápside (N- y C- terminal representado con las letras N y C, respectivamente). **B)** Pentámero formado por las subunidades A que se observan en amarillo. **C)** Capsómero hexamérico formado por las subunidades B (azul) y C (verde), en su centro se observa un poro de alrededor de 6 Å de diámetro (Lucas et al., 2002).

De acuerdo con la cinética del crecimiento del ensamblaje de las cápsides, este proceso es sigmoideo y dependiente del tiempo. Aunque existe una concentración crítica por debajo de la cual no se produce un ensamblaje notable, el incremento en la concentración de CP acelera la tasa de reacción, que adicionalmente puede ser mejorada en condiciones de temperatura baja, obteniendo reacciones de ensamblaje que toman al menos 24 horas (Chen et al., 2008).

El reensamble de las unidades de CP es beneficiado cuando el cambio de condiciones en el proceso de diálisis va desde pH 7.4 y 1 M de NaCl a pH 5 y 0.1 M de NaCl, resultando moléculas estables (Pfeiffer & Hirth, 1974). Al tener 70 % de identidad y ser altamente homólogos BMV y CCMV (Lucas, et al., 2002), se estima que las condiciones de ensamblaje de CCMV son reproducibles para BMV, las cuales requieren que el reensamble sea de preferencia preferible a pH 4.8 con alta fuerza iónica, y de igual manera que en BMV, es más eficiente en presencia de cationes divalentes, como  $Mg^{2+}$  (Lavelle et al., 2007).

Adicionalmente, BMV muestra comportamientos interesantes relacionados con la estructura de la cápside y con diversas condiciones fisicoquímicas. Esta conducta se observa cuando BMV se encuentra disociado en dímeros y ocurren mutación o eliminación de cierto número de aminoácidos en la región N-terminal de CP, la estructura T=3 puede presentar un rearrreglo en su configuración, dando como resultado cápsides con una conformación T=1. Sin embargo, también puede existir el caso donde la estructura icosaédrica directamente se condense de T=3 a T=1 por desprendimiento de los capsómeros hexaméricos, como consecuencia de la exposición a altas concentraciones de  $CaCl_2$  a alta fuerza iónica, estas partículas tienen un diámetro de alrededor de 17-18 nm, similar a la de una partícula icosaédrica T=1 (Lucas et al., 2001).

Otro comportamiento interesante, y utilizable para la encapsulación de materiales, es la expansión radial reversible (hinchamiento) del BMV que está correlacionada con el aumento del pH. Strugała en el 2017, analizó dicho proceso observando que con NaF 0.1 M a pH 5.6, el tamaño de los viriones es de 29.06 nm, y observó que a pH 8.4, alcanzó un diámetro de 31.08 nm. Por lo que sugirió que

su punto isoeléctrico es pH 6.4, ya que dicha expansión podría ser consecuencia de cambiar la carga neta neutra de CP en pH 6.4 a negativa en pH 7.4, aumentando así las fuerzas repulsivas entre las unidades de CP y el ARN genómico cargado negativamente. La plasticidad característica de las cápsides vacías de los bromovirus también se logra explicar con las interacciones del C-terminal, particularmente con  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ , debido a las repulsiones de los grupos carboxilo que promueven la separación de las subunidades entre pH 6 y 7 (Lucas et al., 2002).

### **2.2.3 Usos del BMV**

Entre las principales aplicaciones del BMV se encuentran los estudios enfocados a la biología celular. BMV se ha utilizado como modelo para estudiar la expresión génica, la replicación y recombinación del ARN, las interacciones virus-huésped, el ensamble y la encapsulación del ARN de cadena positiva. Estos principios se extienden a una gran variedad de virus. Dentro de los estudios del BMV, se analizó la capacidad de diseñar la expresión de transcripciones y se encontró un medio para manipular el genoma viral del ARN (He et al., 2020).

Uno de los primeros usos de estos nuevos enfoques, se realizó en la expresión de otros genes insertos en el genoma viral, los cuales fueron capaces de conservar su capacidad de replicación y expresión, como en el caso de la inserción de un gen reportero bacteriano, de la enzima cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), dentro del RNA3 de BMV que, al ser replicado, adquirió la actividad del CAT. Este último y diversos estudios más, demostraron las funciones del genoma de una manera flexible y tolerable a cambios como la inserción de genes, representando un avance para la evolución de virus, biotecnología y aplicaciones para vectores de expresión génica (Ahlgquist et al., 1987; He et al., 2020).

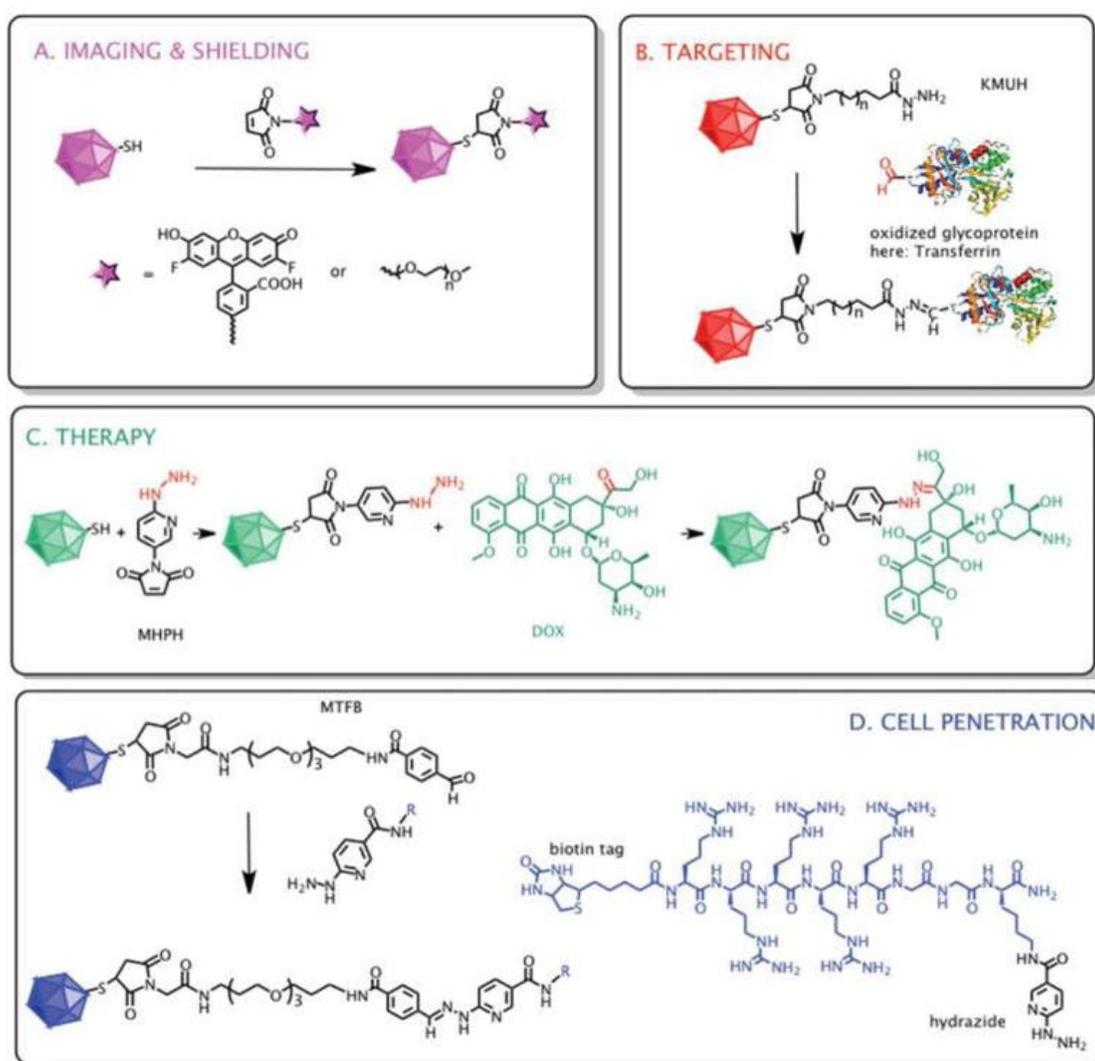
Entre las investigaciones recientes del BMV, también se encuentra el uso de la cápside del virus para la formación de VLPs. La obtención de estos nanovehículos a partir de BMV se ha realizado principalmente mediante la replicación de viriones en plantas infectadas como *Nicotiana benthamiana* o *Hordeum vulgare*. Los virus obtenidos son purificados por gradientes de sacarosa o de cloruro de cesio. Posteriormente, mediante su capacidad de ensamble y desensamble, el virus se disocia hasta sus subunidades proteicas para separar el material genético o ARN y finalmente, se recolectan solo las proteínas de cápside (CP) y se utilizan para la formación de VLPs (Dragnea et al., 2003; Lucas et al., 2002).

Diversos materiales se han utilizado para los estudios de encapsulamiento dentro de la cavidad vacía de estas VLPs de BMV como:

- **Nanopartículas de oro** de entre 2.5 - 4.5 nm de diámetro, las cuales fueron tratadas con citrato para formar una capa intermedia, quedando entre la superficie de oro y la proteína (Dragnea et al., 2003).
- **Nanopartículas de oro** funcionalizadas con polietilenglicol (PEG) con carboxilo terminal, donde la eficiencia de encapsulamiento mejoró, ya que pretendieron simular el comportamiento electrostático del RNA del BMV nativo (Chen et al., 2006). En ambos ensayos de encapsulamiento de nanopartículas de oro, presentaron posibles aplicaciones para imágenes médicas y en la detección bioanalítica.
- **Puntos cuánticos de CdSe/ZnS** (núcleo de seleniuro de cadmio y envoltura de sulfuro de zinc) con una capa de HS-PEG-COOH entre los puntos cuánticos y las proteínas de cápside, proporcionando estructuras estables y uniformes con características similares a los viriones y aplicaciones en el desarrollo de sondas luminiscentes de alto rendimiento (Dixit et al., 2006).

- **Óxido de hierro** funcionalizadas con PEG-fosfolípidos, fueron encapsuladas eficientemente a pesar de presentar un tamaño mayor al de la cavidad del BMV, resultando en estructuras superparamagnéticas con aplicaciones en imágenes de resonancia magnética y materiales biomagnéticos (Huang et al., 2011).
- **Indocianina verde (ICG)**, fue encapsulada mediante interacciones electroestáticas entre la ICG y CP. Esta molécula es un cromóforo de infrarrojo cercano aprobado por la FDA y, al encontrarse dentro de la cavidad de BMV, presentó alta estabilidad óptica a temperatura fisiológica (37°C). Además, mediante células epiteliales bronquiales humanas, obtuvieron imágenes ópticas intracelulares *in vitro*, sin presentar toxicidad. Por lo que, pueden presentar aplicación en la obtención de imágenes ópticas de tejidos profundos y la entrega en sitios específicos (Jung et al., 2011; Gupta et al., 2013).
- **Pequeños RNAs de interferencia** encapsulados mediante interacciones electroestáticas. Las VLPs fueron cargadas con siRNA contra la proteína verde fluorescente (siGFP) y de manera paralela, con siRNA contra Akt1 (siAkt1), una cinasa involucrada en los procesos de proliferación, migración y transformación celular. En cada caso se observó la inhibición de GFP y con Akt1, el crecimiento tumoral en ratones. Además, encapsulando un fluoróforo, NanoOrange, en la cápside de BMV y CCMV, en ambas VLPs se evaluó la capacidad de internalización celular en células tumorales mamarias, en las cuales no se observaron efectos citotóxicos después de la internalización. Sin embargo, solo el BMV no activó macrófagos *in vitro*, sugiriendo que estas VLPs son menos inmunogénicos en comparación con el CCMV (Nuñez et al., 2020).

Además de los ensayos de encapsulamiento en la cavidad de las VLPs de BMV, también se ha evaluado la modificación química y genética de la superficie de la cápside para mejorar el diseño para posibles aplicaciones de imagen y terapéutica (Figura 9). Mediante bioconjugación maleimida-tiol y ligación de hidrazona a mutantes de cisteínas del BMV, se unieron eficientemente colorantes fluorescentes como OregonGreen 488, cadenas de PEG, proteínas localizadoras tumorales como holotransferrina humana, quimioterapéuticos como doxorubicina y péptidos de penetración celular como péptidos R5. En todos los casos sin presentar alteraciones en la estructura de la cápside (Yildiz et al., 2012).



**Figura 9.** Conjugación de diferentes ligandos a la cápside de BMV. A) Colorantes fluorescentes OregonGreen 488 o cadenas de PEG. B) Proteínas localizadoras tumorales, holotransferrina humana. C) Quimioterapéuticos, doxorubicina. D) Péptidos de penetración celular, péptidos R5 (Yildiz et al., 2012).

Dado el enorme potencial de aplicación de las VLPs del BMV, en este trabajo nos propusimos estudiar la expresión heteróloga de la CP de este virus. Existen muy pocos reportes de la expresión de la CP del BMV en *E. coli*, por lo que decidimos explorar el uso de este sistema de expresión, dado el amplio conocimiento que se tiene sobre su uso en la expresión de proteínas heterólogas.

### 3. HIPÓTESIS

Es posible producir la proteína de cápside del virus del mosaico del bromo mediante la sobreexpresión heteróloga en un sistema bacteriano de *E. coli* modificando las condiciones de inducción, como concentración de inductor, tiempo, temperatura y cepa usada. Esta proteína recombinante será competente para el ensamble de partículas tipo virus.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo general

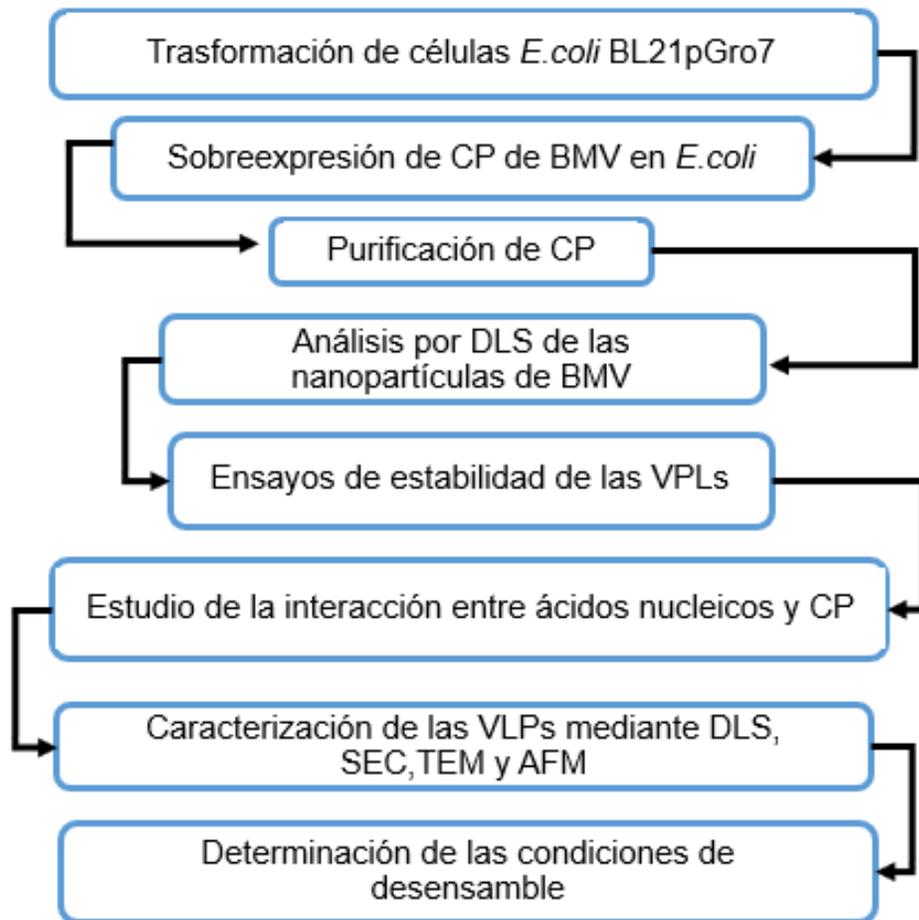
Explorar el potencial de la expresión heteróloga en *E. coli* de la proteína de cápside del virus del mosaico del bromo para la formación de partículas tipo virus.

#### 4.2 Objetivos particulares

- Sobre-expresar la CP del BMV en *E. coli*.
- Purificar la CP en condiciones nativas.
- Probar la competencia de formación de VLPs.
- Evaluar la estabilidad de las VLPs frente a cambios de pH y fuerza iónica en presencia y ausencia de iones  $Mg^{2+}$ .
- Analizar la interacción entre CP de BMV y ácidos nucleicos de *E. coli*.
- Determinar las condiciones de desensamble de las VLPs.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Metodología general



**Figura 10.** Representación esquemática de la metodología general a desarrollar en el proyecto “Expresión de la proteína de cápside del virus del mosaico del bromo en *E. coli* y su ensamble en partículas tipo virus”

## 5.2 Materiales

### Reactivos químicos

1,4-Ditiotreitol (DTT)	Acetato de sodio (AcONa)
Acetato de uranilo	Ácido acético glacial (AcOH)
Ácido cítrico	Ácido clorhídrico (HCl)
Ácido etilendiamino tetracético (EDTA)	Adenosina 5 -trifosfato (ATP)
Agar LB (Luria-Bertani)	Agarosa UltraPure™
Ampicilina	Azul Brillante R-250
Benzonasa	Bromuro de Etidio
Cloranfenicol	Clorhidrato de Guanidina (GndHCl)
Cloruro de Calcio (CaCl <sub>2</sub> )	Cloruro de magnesio (MgCl <sub>2</sub> )
Cloruro de Sodio (NaCl)	Dodecilsulfato de Sodio (SDS)
Etanol	Fosfato de potasio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )
Fosfato de Sodio dibásico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Fosfato de sodio monobásico (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )
Isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG)	L-arabinosa
L-Arginina	Medio LB (Luria-Bertani)
Membrana para diálisis	SYPRO Ruby
Tris-HCl	Tritón X-100
Urea	

<b>Equipo</b>	<b>Marca</b>
Balanza analítica BP 221S	Sartorius
Balanza de dos platos	
Baño refrigerante	Hoefer Scientific Instruments
Centrifuga Refrigerada 5702 R	Eppendorf
Centrifuga Refrigerante RC 6+	Thermo Scientific Sorvall
Cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC)	Äkta
Espectrofotómetro biochrome	Libra
Incubadora MaxQ400	Thermo Scientific
Micro Centrifuga 5418	Eppendorf
Micropipetas (2.5, 5, 20, 100, 200, 1000 mL)	Eppendorf/Gilson
Microscopio de fuerza atómica	Innova Veeco Instruments Inc
Microscopio de transmisión electrónica	JEOL JEM-ARM200F
pHmetro 700	Oakton
Sonicador CPX 750	Cole Parmer
Speed Vac SC110	Savant
Termobloque	Labnet
Termomixer confort	Eppendorf
Trans-iluminador UV T1203	Sigma
Vortex	Gilson
Zetasizer $\mu$ V	Malvern Instruments

## 5.3 Metodología

### 5.3.1 Transformación bacteriana.

La transformación bacteriana se realizó mediante el método de choque térmico. Se utilizaron células competentes de *E. coli* BL21(DE3) y *E. coli* BL21pGro7, además del vector pET-CP. Este plásmido fue adquirido comercialmente (Bio Basic, Canada) y posee la secuencia del gen optimizada que codifica a la proteína de cápside del BMV clonada entre los sitios *NdeI* y *EcoRI* del sitio de clonación múltiple del vector comercial pET22b(+), por lo que no posee His-tag. El plásmido fue hidratado con 100  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril. Posteriormente se agregó 1  $\mu\text{L}$  de la solución del plásmido a la alícuota con 50  $\mu\text{L}$  de células competentes, sin contacto con la superficie inferior de la alícuota para evitar una transferencia de calor. Estas células con el plásmido se incubaron directamente en hielo por 30 min.

Al finalizar el tiempo de la primera incubación, la alícuota fue transferida a un termobloque que previamente se mantuvo a una temperatura de 42°C. Se dejó incubando por 50 s a dicha temperatura para inducir el choque térmico y de esta manera lograr la entrada del plásmido a las células bacterianas. Después, se volvió a conservar por 2 min en hielo y en seguida se adicionaron y mezclaron 500  $\mu\text{L}$  de medio Luria-Bertani (LB) para llevarlas a una etapa de recuperación donde fueron incubadas durante 40 min a 37°C con agitación de 220 rpm.

Finalmente, 50  $\mu\text{L}$  de células transformadas fueron inoculadas con ayuda de perlas de vidrio para aumentar la distribución en cajas de Petri que contenían agar LB preparadas con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina y 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cloranfenicol. Las cajas inoculadas se mantuvieron en incubación durante toda la noche a 37°C. Al siguiente día, se corroboró la existencia de placas con colonias aisladas, las cuales serían utilizadas para la obtención de proteína.

### **5.3.2 Sobre-expresión de la proteína de cápside.**

La sobre-expresión de CP se realizó por medio de una colonia aislada de *E. coli* BL21pGro7 transformada con el plásmido pET-CP. Esta colonia se inoculó en 10 mL de medio LB con 100 µg/mL de ampicilina y 20 µg/mL de cloranfenicol, se dejó incubando durante toda la noche (ON) a 37°C con agitación de 220 rpm. Del cultivo anterior se inocularon los tubos necesarios para los ensayos de inducción, cada uno de ellos con 100 µL del cultivo ON en 10 mL de medio LB que contenían 100 µg/mL de ampicilina, 20 µg/mL de cloranfenicol y 0.5 mg/mL de L-arabinosa. El cultivo se mantuvo a 37°C con agitación de 220 rpm alrededor de 4-5 h, hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> (densidad óptica, DO, a una longitud de onda de 600 nm) de aproximadamente 0.6-0.8. Antes de la inducción de CP se tomó una muestra de 1 mL del medio de cultivo y en seguida se realizó la inducción con IPTG. La sobre-expresión de CP fue evaluada a diferentes concentraciones de IPTG (0.2, 0.6 y 1.0 mM) a temperaturas de 25, 30 y 37°C y con tiempos de inducción de 2, 4, 6, 16 y 24 h, tomando muestras del medio de cultivo para posteriores análisis. De manera que, para comparar los resultados de la inducción, todas las muestras antes y después de la inducción se llevaron a una DO<sub>600</sub> de 0.6., de estas muestras se tomaron 100 µL y se centrifugaron a 5,000 rpm por 15 min, el sobrenadante fue desechado y el pellet celular se resuspendió en 20 µL de agua destilada. Las muestras antes y después de la inducción fueron analizadas por SDS-PAGE en un gel de proliacrilamida al 12.5% para determinar las condiciones de sobre-expresión.

### **5.3.3 Escalamiento del cultivo celular.**

Al obtener sobre-expresión de CP en 10 mL de medio, se intentó escalar el volumen de producción. Por lo tanto, se inoculó una colonia aislada en un tubo con 10 mL de LB con 100 µg/mL de ampicilina y 20 µg/mL de cloranfenicol. Se dejó

creciendo durante toda la noche a 37°C con agitación de 220 rpm. Al siguiente día, se inocularon los siguientes volúmenes de medio, cada uno ocupando el 20% de la capacidad del matraz (Tabla 1):

**Tabla 1.** Escalamiento de cultivos celulares. Volumen de producción en 50, 100 y 250 mL

<b><i>Matraz Erlenmeyer</i></b> <b>(mL)</b>	<b><i>Medio LB</i></b> <b>(mL)</b>	<b><i>Inóculo ON</i></b> <b>(mL)</b>
250	50	0.5
500	100	1
1000	250	2.5
2000	500	5

Cada matraz con antibióticos a una concentración final 100 µg/mL de ampicilina, 20 µg/mL de cloranfenicol y 0.5 mg/mL de L-arabinosa. Los cultivos se mantuvieron a 37°C con agitación de 220 rpm hasta alcanzar una  $DO_{600} = 0.6-0.8$ . Posteriormente, se llevó a cabo la inducción con IPTG a una concentración final de 0.6 mM durante toda la noche. La expresión de CP fue analizada por SDS-PAGE en un gel de proliacrilamida al 12.5 %.

### **5.3.4 Purificación de CP**

#### **5.3.4.1 Lisis celular**

El medio obtenido mediante escalamiento (500 mL) se centrifugó a 6,000 rpm por 15 min a 4°C, el sobrenadante se desechó y el pellet celular se resuspendió en 100 mL de solución de NaCl 0.9%. Después se volvió a centrifugar a 6,000 rpm por 15 min a 4°C, de esta manera se realizaron dos lavados al pellet, siempre manteniendo los tubos en hielo. Al finalizar la centrifugación del último lavado, el

sobrenadante de solución salina se desechó y el pellet se resuspendió en un volumen de amortiguador de lisis correspondiente al 10% del volumen inicial del medio de cultivo, en este caso con 50 mL de amortiguador de lisis previamente frío (Tabla 2)

**Tabla 2.** Amortiguador de lisis.

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>	<b>pH</b>
<i>Tris-HCl</i>	50 mM	7.5
<i>NaCl</i>	150 mM	
<i>Tritón X100</i>	0.2 %	
<i>DTT</i>	1 mM	

El pellet con amortiguador de lisis se transfirió a un vaso de precipitados y éste se colocó en hielo para llevar a cabo el proceso de lisis celular por sonicación, el cual se realizó durante 1 min con pulsos de 10 s y pausas de 10 s con 2 min de descanso; el ciclo se repitió 7 veces con una amplitud de 35%. Al finalizar, la muestra se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min a 4°C. El pellet y sobrenadante se separaron y analizaron por SDS-PAGE en un gel de proliacrilamida al 12.5%, para determinar el estado de la CP (soluble o insoluble en cuerpos de inclusión).

#### **5.3.4.2 Degradación de ácidos nucleicos de *E. coli***

Las proteínas solubles en amortiguador de lisis se dializaron durante 4-5 h a 4 °C contra 50 volúmenes de amortiguador 20 mM Tris-HCl pH 8 para quitar el NaCl y cambiar el pH. Al finalizar la diálisis, se recuperó la muestra y se adicionó el volumen correspondiente a 25 unidades de la enzima benzonasa, la cual es capaz de digerir RNA y DNA de cadena simple, doble, lineal y circular a oligonucleótidos, sin actividad proteolítica. Además de las unidades de benzonasa, se adicionó MgCl<sub>2</sub>

1.5 mM para su activación. Posteriormente, la muestra con la enzima adicionada se colocó en un Thermomixer comfort a 37 °C durante 20 min con agitación orbital de 300 rpm.

Finalizado el tiempo, la muestra se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min. Después se tomaron 20 µL de muestra para analizar la degradación de ácidos nucleicos mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, el cual corrió en solución amortiguadora TAE (Tabla 3) a un voltaje de 90 V por aproximadamente 1 hora. El gel se tiñó con 10 µL de bromuro de etidio (10 mg/mL) diluido en 50 mL de amortiguador TAE durante 20 min y se observó en un transiluminador de luz UV.

**Tabla 3.** Amortiguador TAE

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración mM</b>	<b>pH</b>
<i>Tris-HCl</i>	35	7.5
<i>Ácido acético</i>	20	
<i>EDTA</i>	1.2	

#### **5.3.4.3 Separación del sistema de chaperonas GroES-GroEL de CP**

La muestra de proteínas solubles obtenidas por sonicación se dializó 4-5 h a 4 °C contra 100 volúmenes de amortiguador 20 mM Tris-HCl pH 8. Al finalizar la muestra se recuperó y adicionó ATP y MgCl<sub>2</sub> hasta una concentración final de 5 mM para ambos reactivos, dejándola reaccionar ON a baja temperatura en agitación magnética suave.

La muestra que fue tratada con benzonasa, de igual manera se le adicionó ATP y MgCl<sub>2</sub> hasta una concentración final de 5 mM para ambos reactivos y se dejaron reaccionar bajo las mismas condiciones.

#### **5.3.4.4 Cromatografía de intercambio aniónico**

La muestra después del cambio de amortiguador y adición de ATP y MgCl<sub>2</sub>, fue aplicada a una columna de intercambio aniónico SOURCE 15Q 4.6/100 PE, con una matriz de poliestireno/divinilbenceno que contiene una amina cuaternaria cargada positivamente como grupo activo. La columna fue cargada pasando 20 mL del amortiguador 20mM Tris-HCl pH 8 y 1M NaCl y en seguida equilibrada con 50 mL de amortiguador de 20mM Tris-HCl pH 8, hasta observar que el pH del eluyente corresponda con el pH del amortiguador en equilibrio. Ambos amortiguadores previamente filtrados con una membrana de poros de 0.22 µm y desgasificados.

Posteriormente se cargaron 10 mL de muestra previamente centrifugada a 14,000 rpm por 10 min y filtrada con una membrana de 0.22 µm. Esta muestra fue pasando por la columna a un flujo de 1 mL/min, recolectada en fracciones de 5 mL y seguida por medio de UV-Vis ajustado a una longitud de onda de 280 nm. La elución de las proteínas que interaccionaron con la matriz de la columna se llevó a cabo mediante el incremento de la fuerza iónica en dos pasos, el primero con amortiguador de 20 mM Tris-HCl pH 8 y 0.5 M NaCl y el segundo con 20 mM Tris-HCl pH 8 y 1 M NaCl.

De las fracciones recolectadas durante la cromatografía se tomaron 30 µL y se analizaron por SDS-PAGE en un gel de proliacrilamida al 12.5%. A partir de este gel, se seleccionaron aquellas fracciones que contenían la proteína de la cápside del virus.

#### **5.3.4.5 Ensamble de las proteínas de cápside.**

Las fracciones recuperadas por cromatografía de intercambio aniónico con CP sin chaperonas se dializaron con una membrana de diálisis contra 100 volúmenes de amortiguador de desensamble (tabla 3), en condiciones de temperatura baja durante 16 h.

**Tabla 4.** Amortiguador de desensamble

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>	<b>pH</b>
Tris-HCl	20 mM	7.5
NaCl	1 M	
DTT	1 mM	

Después de las 16 h, el amortiguador de desensamble se cambió por 100 volúmenes de amortiguador de ensamble (tabla 4) y se dializó en condiciones de temperatura baja durante 24 h. Posteriormente, para eliminar las proteínas precipitadas por el cambio de pH, la muestra se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min a una temperatura de 4°C.

**Tabla 5.** Amortiguador de ensamble

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración (mM)</b>	<b>pH</b>
AcONa	53	4.8
AcOH	47	
MgCl <sub>2</sub>	10	
NaCl	100	
DTT	1	

#### **5.3.4.6 Cromatografía de exclusión molecular (SEC)**

El último paso de purificación se realizó mediante la columna 16/600Superdex 200 compuesta de agarosa y dextrano. Por lo que, el amortiguador de ensamble previamente filtrado y desgasificado se utilizó para equilibrar la columna y como fase móvil. La muestra para analizar se filtró con membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  y en seguida se inyectó a la columna. Esta corrida se llevó a cabo con un flujo de 1 mL/min, recolectando fracciones de 5 mL y el seguimiento de la proteína mediante UV-Vis a una longitud de onda de 280 nm. Finalmente, las fracciones recolectadas se analizaron mediante SDS-PAGE en un gel de proliacrilamida al 12.5% y por DLS.

#### **5.3.5 Análisis por Dispersión Dinámica de Luz (DLS)**

La muestra recolectada en las primeras fracciones de la cromatografía de exclusión molecular se analizó mediante DLS (Dynamic Light Scattering) con el equipo Zetasizer  $\mu\text{V}$ , utilizando como índice de refracción 1.33, viscosidad del medio de 1.003 cP y temperatura de 20°C. La muestra se filtró con una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  y después se transfirió a una celda de vidrio con capacidad de 500  $\mu\text{L}$ . El análisis fue realizado mediante 5 corridas y cada una de ellas con 10 medidas, Por lo que el gráfico presentado en el apartado de resultados es el promedio de los valores obtenidos en las 5 corridas.

#### **5.3.6 Ensayo de estabilidad de VLPs.**

Después de analizar las fracciones obtenidas por SEC mediante SDS-PAGE y DLS, se seleccionaron aquellas que contenían CP purificada y ensamblada con un diámetro hidrodinámico alrededor de 30 nm. Posteriormente la concentración de la proteína se determinó utilizando un espectrofotómetro UV-Vis modelo Nanodrop 2000, con un coeficiente de extinción molar de la proteína, 0.82 (g/L) $^{-1}$ (cm) $^{-1}$  y peso molecular de 20.3 kDa, dando un valor de  $\epsilon/100 = 16.64 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Huang et al., 2011; Huang et al., 2011).

La evaluación de la estabilidad de las VLPs de BMV frente a cambios de pH y fuerza iónica en presencia y ausencia de iones  $Mg^{2+}$ , se realizó con una muestra diluida con amortiguador de ensamble hasta una concentración alrededor de 0.3 mg/mL, de la cual se tomaron 600  $\mu$ L y se colocaron en membranas de diálisis contra un volumen de 50 mL de diferentes amortiguadores durante 16 h a temperatura baja y con agitación magnética.

La diálisis de la muestra se llevó a cabo mediante amortiguadores con valores de pH que representaran los principales cambios estructurales en las VLPs. Estos valores de pH correspondientes a 4.8, en el cual se sabe que las nanopartículas se encuentran ensambladas y estables; pH 6.4 en el que se observa una expansión radial reversible de las partículas (hinchamiento), comportamiento característico de los *Bromovirus*; y pH 8.4, representante del desensamble de las VLPs y formación de dímeros. Además de los diferentes valores de pH, también se evaluaron concentraciones de 0.1, 0.5 y 1.0 M de NaCl, ya que la fuerza iónica representa un papel importante en la estabilidad del virus, así como la presencia de  $Mg^{2+}$ . Por lo que, para evaluar la estabilidad de las cápsides sin la presencia de  $Mg^{2+}$ , se agregó al amortiguador EDTA 10 mM. El diseño experimental de las 30 condiciones a evaluar y los amortiguadores utilizados se representan en las siguientes tablas.

**Tabla 6.** Condiciones para evaluar la estabilidad de las VLPs de BMV.

		<b>pH</b>									
<b>NaCl</b>	<b>M</b>	<b>4.8</b>		5.6		<b>6.4</b>		7.5		<b>8.4</b>	
		<b>(ensamble)</b>				<b>(hinchamiento)</b>				<b>(desensamble)</b>	
<b>0.1</b>		Mg	EDTA	Mg	EDTA	Mg	EDTA	Mg	EDTA	Mg	EDTA
<b>0.5</b>		Mg	EDTA	Mg	EDTA	Mg	EDTA	Mg	EDTA	Mg	EDTA
<b>1</b>		Mg	EDTA	Mg	EDTA	Mg	EDTA	Mg	EDTA	Mg	EDTA

**Tabla 7.** Amortiguador para diferentes valores de pH

<b>pH</b>	<b>Reactivo</b>	<b>Concentración (mM)</b>
4.8	AcONa	53
	AcOH	47
5.6,6.4	Ácido cítrico	19.7, 13.6
	Fosfato de sodio dibásico	30.3, 36.4
7.5,8.4	Tris-HCl	20

Al finalizar el tiempo de diálisis, la muestra se recuperó y analizó mediante DLS para obtener los diámetros hidrodinámicos de las VLPs en las nuevas condiciones. De este ensayo se tomaron 6 condiciones:

- 1) pH 4.8 con concentración de NaCl 1.0 M con MgCl<sub>2</sub> 10 mM
- 2) pH 4.8 con concentración de NaCl 1.0 M con EDTA 10 mM
- 3) pH 6.4 con concentración de NaCl 0.5 M con MgCl<sub>2</sub> 10 mM
- 4) pH 6.4 con concentración de NaCl 0.5 M con EDTA 10 mM
- 5) pH 8.4 con concentración de NaCl 0.1 M con MgCl<sub>2</sub> 10 mM
- 6) pH 8.4 con concentración de NaCl 0.1 M con EDTA 10 mM

Y se caracterizaron por cromatografía de exclusión molecular mediante la columna Superdex 200 GL 10/300. Por lo que, en cada caso, el amortiguador correspondiente se utilizó para equilibrar la columna y como fase móvil.

### 5.3.7 Tinción de proteína en gel de agarosa

La muestra de proteína purificada y ensamblada con una concentración alrededor de 0.5 mg/mL se analizó en un gel de agarosa con una base de soporte al 2% y el resto del gel a una concentración de 1%. El mismo gel se corrió por duplicado, en una parte se tiñeron los ácidos nucleicos con bromuro de etidio y en la otra parte se tiñó la proteína con la tinción fluorescente de *SYPRO Ruby*. El gel de agarosa corrió en solución amortiguadora TAE (Tabla 3) a un voltaje de 90 V por aproximadamente 1 h. Al finalizar el tiempo, una parte del gel se tiñó con 10 µL de bromuro de etidio diluido en 50 mL de amortiguador TAE durante 20 min y se observó mediante un transiluminador de luz UV.

En cuanto a la tinción de proteína, primero se fijó la muestra al gel con 200 mL de una solución fijadora (tabla 8) durante 30 min para lograr que el pH alcalino en el que fue preparado el gel alcanzara un pH ácido y de esta manera mejorar la eficiencia en la tinción de proteína

**Tabla 8.** Solución fijadora para tinción con SYPRO Ruby

Reactivo	Concentración %
Etanol	50
Ácido acético	3

Posteriormente, el gel se transfirió a un recipiente cubierto totalmente con papel aluminio para evitar el paso de luz durante la tinción y se le añadió 150 mL de solución SYPRO ruby, que de igual manera se agregó en condiciones de poca luz, la tinción se realizó durante 12 h con agitación baja. Por último, la solución de tinción se deshechó y el gel se destiñó con una solución desteñidora (tabla 9) durante 4 h con agitación baja y con el recipiente cubierto. Al finalizar, el gel se observó mediante un transiluminador de luz UV.

**Tabla 9.** Solución desteñidora

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración %</b>
Etanol	10
Ácido acético	7

### **5.3.8 Caracterización estructural de las VLPs**

#### **5.3.8.1 Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)**

La muestra con la proteína purificada y ensamblada obtenida por SEC se diluyó con amortiguador de ensamble hasta una relación 1:1x10<sup>-9</sup>. Posteriormente se filtró por una membrana de 0.45 µm y después por otra membrana de 0.22 µm. De esta muestra se tomó 1 µL y se añadió en la superficie de un disco de mica grado V1 de 12 mm de diámetro a la que previamente se le retiró cualquier residuo que provocara interferencia con la microscopia. La adhesión de la muestra a la mica se llevó a cabo mediante secado por 15 min en condiciones de vacío a temperatura ambiente. Al finalizar el tiempo, la mica fue lavada con 3 ciclos con agua desionizada para eliminar cualquier residuo y sales presentes en la muestra y filtrada por una membrana de 0.45 y 0.22 µm, Después se volvió a llevar a sequedad por 30 min en condiciones de vacío a temperatura ambiente. Finalmente, el análisis de la muestra se llevó a cabo en un microscopio de sonda de barrido Veeco Innova que cuenta con una sonda de barrido de alta resolución Hi`Res-C19/Cr-Au.

#### **5.3.8.2 Microscopia de Transmisión Electrónica (TEM)**

La muestra obtenida por SEC se diluyó con amortiguador de ensamble hasta una relación 1:100. Posteriormente se filtró por una membrana de 0.45 µm y después por otra membrana de 0.22 µm. De esta muestra se tomaron 20 µL y se agregaron a una rejilla cubierta con formvar durante 5 min. Al finalizar el tiempo se retiró el exceso de muestra con papel filtro e inmediatamente se agregaron 6 µL de

acetato de uranilo al 1% como medio de contraste, dejando reaccionar por 2 min y retirando el exceso con papel filtro por las orillas de la rejilla. La muestra se analizó en un microscopio de transmisión electrónica JEOL JEM-ARM200F con un voltaje de 200 kV.

### **5.3.9 Condiciones de desensamble**

El desensamble de las VLPS se llevó a cabo mediante el análisis del efecto del pH y la adición de agentes caotrópicos como urea y guanidina. En cuanto al cambio de pH, las muestras de VLPs a una concentración de proteína de 0.3-0.4 mg/mL en amortiguador AcONa 53 mM, AcOH 47 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 100 mM, DTT 1 mM a pH 4.8, se dializaron con una membrana de diálisis contra 100 volúmenes de los diferentes amortiguadores de manera independiente:

- 1) Tris-HCl 20 mM, NaCl 1M, DTT 1 mM, EDTA 10 mM a pH 8.4,
- 2) PBS, NaCl 1M, DTT 1mM, L-arginina 0.2M, EDTA 10 mM a pH 7.4
- 3) Tris-HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.5M, DTT 1mM, EDTA 10mM a pH 8

Para cada caso, en condiciones de temperatura baja con agitación durante 24 h para el amortiguador 1) y 16 h para los amortiguadores 2) y 3). Al finalizar el tiempo, la muestra se filtró con una membrana de 0.22 µm y los cambios en el diámetro hidrodinámico de las VLPs se evaluaron mediante DLS.

El amortiguador Tris-HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.5 M, DTT 1 mM, EDTA 10 mM a pH8, se utilizó para llevar a cabo la adición de urea y guanidina. Por lo que, al finalizar la diálisis con dicho amortiguador, cada muestra se recuperó y se adicionó la cantidad necesaria para alcanzar las concentraciones de 1, 2, 3, 4 y 5 M de urea y 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 para guanidina. En cada caso, la muestra se suspendió hasta homogenizar y posteriormente se filtró con una membrana de 0.22 µm, los cambios en el diámetro hidrodinámico de las VLPs se evaluaron mediante DLS.

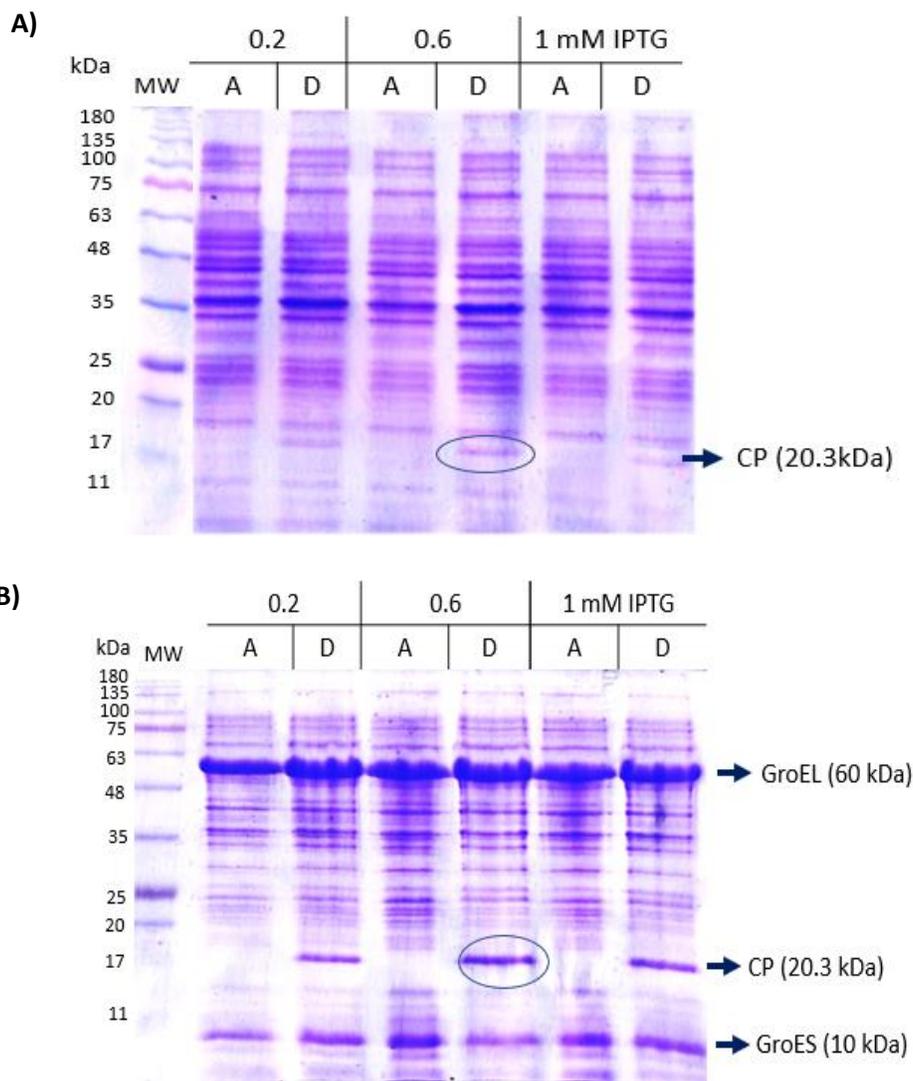
## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Células bacterianas transformantes y sobreexpresión de la proteína de cápside (CP) del BMV.

Posterior a la transformación bacteriana, se obtuvieron varias colonias aisladas de *E. coli* BL21(DE3), a partir de las cuales se llevó a cabo la evaluación de las condiciones de inducción para encontrar aquellas que aumentarían la sobreexpresión de CP, debido a que la producción de nanopartículas virales de BMV se obtiene principalmente en sistemas de plantas infectadas como *Nicotiana benthamiana* (Yildiz et al., 2012; Sun et al., 2007) y *Hordeum vulgare* (Jung et al., 2011; Huang et al., 2011; Nuñez et al., 2020), y no en sistemas bacterianos.

En los cultivos de *E. coli* BL21(DE3), la inducción se evaluó con concentración de IPTG de 0.2, 0.6 y 1 mM; tiempos de 2, 4, 6, 16 y 24 h, a temperaturas de 25, 30 y 37°C, con agitación de 220 rpm, y para la temperatura de 25°C con agitación de 180 rpm. Los resultados de la expresión de CP fueron analizados mediante SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 12.5%. La mayor expresión de CP en *E. coli* BL21(DE3) se obtuvo con una concentración de 0.6 mM de IPTG con 16 h de inducción a 25°C y 180 rpm (Figura 11A). Condiciones similares en las que se obtuvo una alta sobreexpresión de la proteína de cápside de CCMV, virus que anteriormente se mencionó que presenta 70% de identidad con respecto a la CP de BMV (Lucas, et al., 2002). La proteína de CCMV se expresó en la cepa de *E. coli* Rosetta 2 (DE3)pLysS con una  $DO_{600}=0.6$ , inducidas con 0.5 mM de IPTG por 16 h a 20°C (Díaz et al., 2015). Recientemente, Strugala et al. en el 2021, expresó CP de BMV silvestre y mutante, con la misma cepa Rosetta 2(DE3)pLysS y en las mismas condiciones de inducción que CCMV, tanto para CP silvestre como mutante, obteniéndolas en forma soluble. La banda que aparece tras la inducción presenta una masa molecular aparente menor a la teórica de 20.3 kDa. Este desplazamiento anómalo en SDS-PAGE ha sido reportado en otras proteínas y se ha explicado a través de distintos modos de interacción del SDS con las proteínas, así como por la presencia de estructura terciaria residual en las

condiciones desnaturalizantes empleadas (Rath et al., 2009). Por otra parte, en un reporte del grupo de Steinmetz, la CP de BMV también presenta un peso molecular aparente de 17 kDa por SDS-PAGE (Wen et al., 2012). Nuestros resultados posteriores evidenciaron que, en efecto, la banda que aparece en los geles corresponde a una proteína capaz de formar VLPs.



**Figura 11.** SDS-PAGE de la expresión de CP en la cepa de *E. coli* A) BL21(DE3) B) BL21pGro7. Se muestran los carriles MW) marcador de peso molecular, (A) antes y (D) después de la inducción para las concentraciones de 0.2, 0.6 y 1 mM IPTG a A) 25 °C por 16 h y 180 rpm y B) 37 °C, 16 h y 220 rpm.

Debido a la baja producción de CP en la cepa BL21(DE3), se transformó la cepa de *E. coli* BL21pGro7, la cual contiene un complejo de chaperonas GroEL-GroES. Al igual que con la cepa BL21(DE3), se realizaron ensayos de

sobreexpresión variando las condiciones de inducción (IPTG de 0.2, 0.6 y 1 mM; tiempo de 2, 4, 6, 16 y 24 h; temperatura de 25, 30 y 37°C). Encontramos que la concentración de 0.6 mM de IPTG con 16 h de inducción a 37°C y 220 rpm (Figura 11B) aumentaba la expresión de CP en comparación con la expresión obtenida con la cepa. BL21(DE3).

Dado lo anterior, las condiciones de producción de CP del BMV que se establecieron son: medios de cultivo con concentraciones finales de 100 µg/mL de ampicilina y 20 µg/mL de cloranfenicol como marcadores de resistencia para los plásmidos de CP y el complejo GroEL-GroES, respectivamente; 0.5 mg/mL de L-arabinosa como inductor de las chaperonas; crecimiento del cultivo celular aproximadamente hasta una  $DO_{600}=0.6-0.8$  para comenzar la inducción de CP con 0.6 mM de IPTG por 16 h a 37°C y 220 rpm.

## **6.2 Purificación de CP**

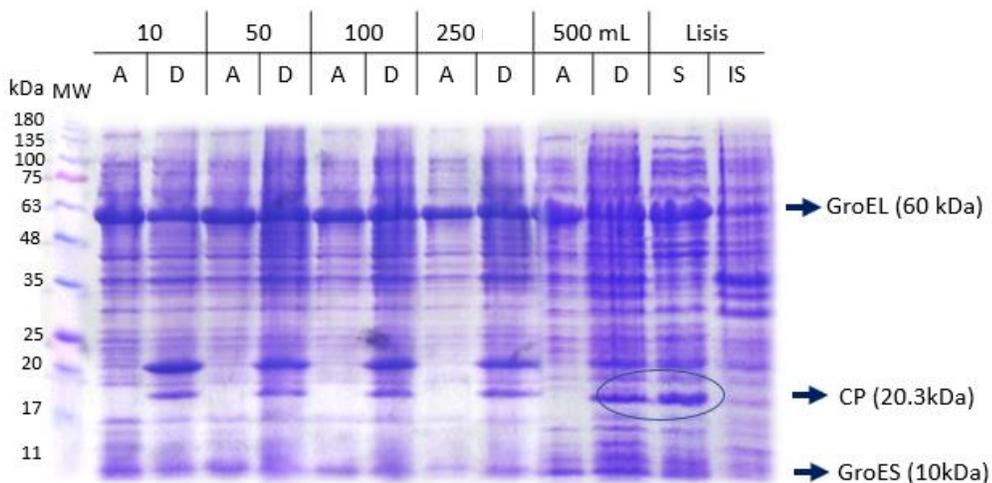
### **6.2.1 Lisis celular**

El proceso de purificación requiere volúmenes más grandes de medio celular, por lo tanto, se evaluó el escalamiento del volumen inicial de inducción de 10 mL. En el caso de la proteína expresada en BL21(DE3), el volumen máximo para obtener expresión de CP fue en 100 mL con las mismas condiciones de inducción que el volumen inicial (0.6 mM IPTG, 25°C, 16 h y 180 rpm). Mientras que en la cepa BL21pGro7, se observó que las condiciones de inducción para 10 mL se pueden emplear en volúmenes de 50, 100, 250 y 500 mL, sin presentar cambios en la sobreexpresión de CP (Figura 12).

Utilizando el volumen escalado (500 mL), se llevó a cabo la primera etapa de purificación de CP, lisis celular por sonicación. En esta etapa, se deseaba analizar si la proteína se encontraba en forma soluble o en cuerpos de inclusión. Para la lisis celular se ocupó un amortiguador similar al utilizado para la purificación de la proteína de la cápside de CCMV (Zhao et al., 1995; Díaz et al., 2015). Este

amortiguador se modificó solo en la concentración del detergente Tritón X-100, con un reajuste en su concentración de 1% hasta 0.2%. Al finalizar la centrifugación del lisado celular, se separaron las dos fracciones, sobrenadante y pellet celular, cada uno se analizó por SDS-PAGE, encontrando a la proteína CP como proteína soluble en la fracción del sobrenadante (Figura 12).

**Figura 12.** SDS-PAGE del escalamiento de la producción de CP y lisis celular. En los carriles MW) se muestra el marcador de peso molecular, A) antes y D) después de la inducción en diferentes volúmenes de medio (10, 50, 100, 250 y 500 mL). En los carriles de lisis: S) representa la fracción soluble en el sobrenadante y IS) la fracción insoluble en el pellet celular



### 6.2.2 Separación del sistema de chaperonas GroES-GroEL de CP

Continuando con el proceso de purificación de CP y con el objetivo de enriquecer la muestra, se precipitó la proteína con sulfato de amonio, como se reportó en la purificación de CCMV (Zhao et al., 1995). Encontramos que la CP precipitó en concentraciones de 5-40%, al igual que el complejo de chaperonas, sin observar un cambio significativo en la relación de concentración entre ellas. Consecuentemente, se decidió que, para llevar a cabo la purificación de CP, las propiedades de mayor importancia tendrían que ser el alto valor de su punto isoeléctrico teórico  $pI=9.64$  (obtenido por la herramienta ProtParam), y la capacidad de auto-ensamblarse en condiciones de pH ácido.

Establecidas las propiedades a considerar para la purificación, se utilizó la columna de intercambio aniónico, debido a que las chaperonas GroEL y GroEs, presentan un punto isoeléctrico de 4.7 y 5.08, respectivamente (Schneider, 2000),

de esta manera se podría separar CP de su principal contaminante. Con sus valores de pI, las proteínas GroEL y GroEs en un amortiguador de bis-Tris 20 mM pH 8.1 tendrían carga negativa, por lo que podrían interactuar con la amina cargada de la matriz de poliestireno/divinilbenceno. CP, por el contrario, tendría carga positiva y no presentaría interacción con la matriz. Sin embargo, al purificar el lisado celular con la columna aniónica, al igual que con la precipitación con sulfato de amonio, no se observó separación entre CP y las chaperonas; ambas proteínas se observaron tanto en las fracciones de muestras que correspondían a proteínas que interactúan y como las que no interactúan.

Estos datos sugieren que la CP y el complejo de GroEL-GroES seguían unidos después de la lisis celular, posiblemente por interacciones hidrofóbicas en un dominio de la cavidad de GroEL. Se sabe que la unión de ATP con GroES, causa una conversión estructural de la superficie interna de GroEL, pasando de una cavidad hidrófoba a hidrófila, donde la proteína unida a GroEL finaliza su plegamiento (Gruber & Horovitz, 2016). Esta cavidad, también presenta una carga neta de -42, donde varios de los aminoácidos con cargas negativas son conservados (Tang et al., 2006). En ese punto, se podría suponer que CP, mediante su N-terminal con cargas positivas, podría interactuar con la cavidad, evitando su liberación y consecuentemente su plegamiento. Otra alternativa, podría sugerir que la escasez de ATP en el medio evita la liberación de CP, ya que, durante el tiempo de plegamiento, se requieren e hidrolizan 7 moléculas de ATP en el dominio de la unión de GroEs y GroEL. Mientras que en el otro dominio de GroEL (sin GroES), se une más ATP causando que GroEs se disocie y al mismo tiempo la proteína plegada emerja de la cavidad de GroEL (Tang et al., 2006).

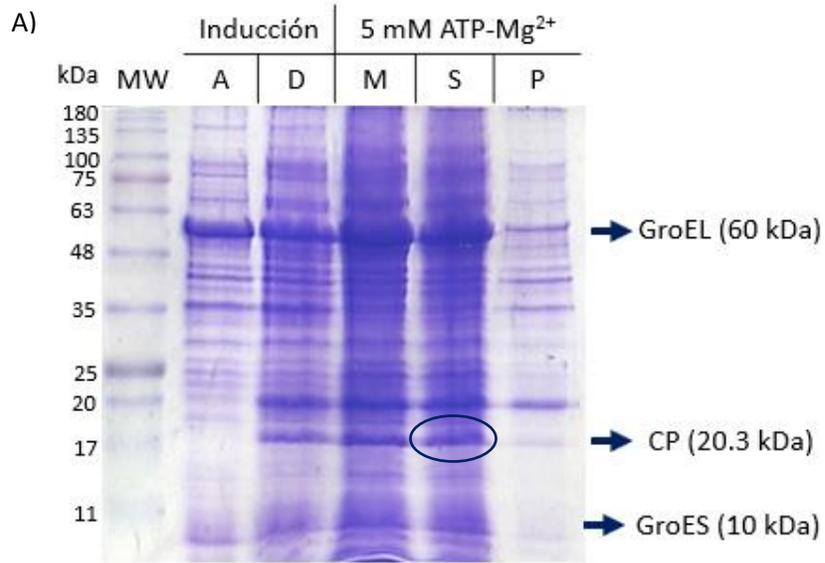
La separación de CP del complejo GroEL-GroES, se evaluó a diferentes concentraciones de ATP-Mg<sup>2+</sup>, 2, 5 y 10 mM para ambos reactivos, concentraciones similares que se han utilizado para estudiar la disociación de proteínas pequeñas (≤30 kDa) de la superficie de GroEL (Marchenkov et al., 2020). La adición de ATP-Mg<sup>2+</sup>, se realizó al finalizar la diálisis de las proteínas presentes en amortiguador de lisis contra amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 8. Después de la adición de ATP-Mg<sup>2+</sup>,

se observó un aumento de turbidez en las muestras en función del aumento de concentración, causando la mayor cantidad de proteínas precipitadas en la muestra tratada con 10 mM de ATP-Mg<sup>2+</sup>. Los resultados de la adición de diferentes concentraciones de ATP-Mg<sup>2+</sup> a la muestra se analizó mediante cromatografía de intercambio aniónico.

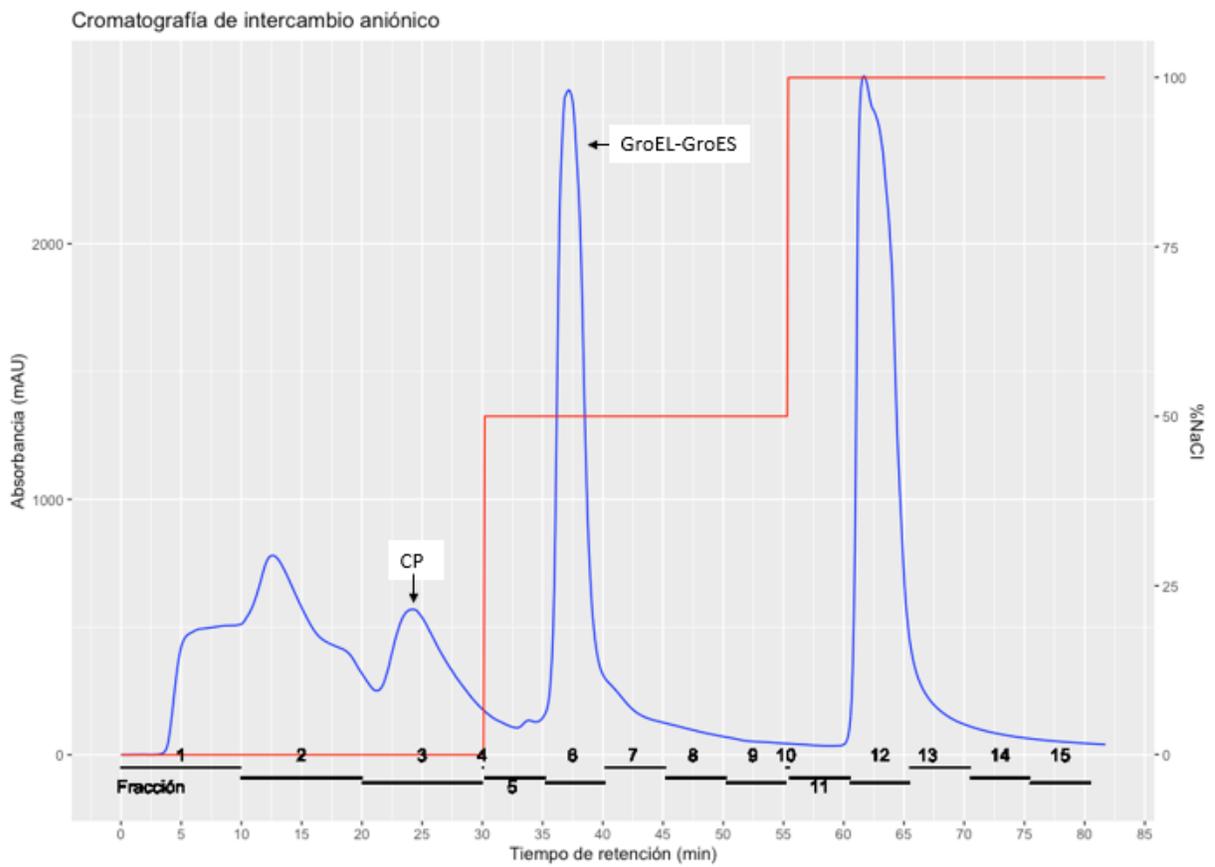
### **6.2.3 Cromatografía de intercambio aniónico**

Las muestras en amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 8, con 2, 5 y 10 mM de ATP-Mg<sup>2+</sup> se purificaron por la columna aniónica, las fracciones recolectadas se analizaron por SDS-PAGE. Los resultados obtenidos sugieren que las muestras tratadas con 2 mM de ATP-Mg<sup>2+</sup> no permiten la completa separación del complejo CP-GroEL-GroES, ya que una gran cantidad de CP se observó en fracciones con alta concentración de chaperonas y en las primeras fracciones (proteína que no interacciona con la columna) se logró obtener CP sin chaperonas, aunque en una cantidad reducida. En cuanto a las muestras tratadas con 10 mM ATP-Mg<sup>2+</sup>, como se mencionó anteriormente, causó la mayor precipitación de proteínas y entre ellas CP, por lo que los resultados obtenidos por cromatografía de intercambio iónico favorecieron solo la purificación de GroEL y GroES.

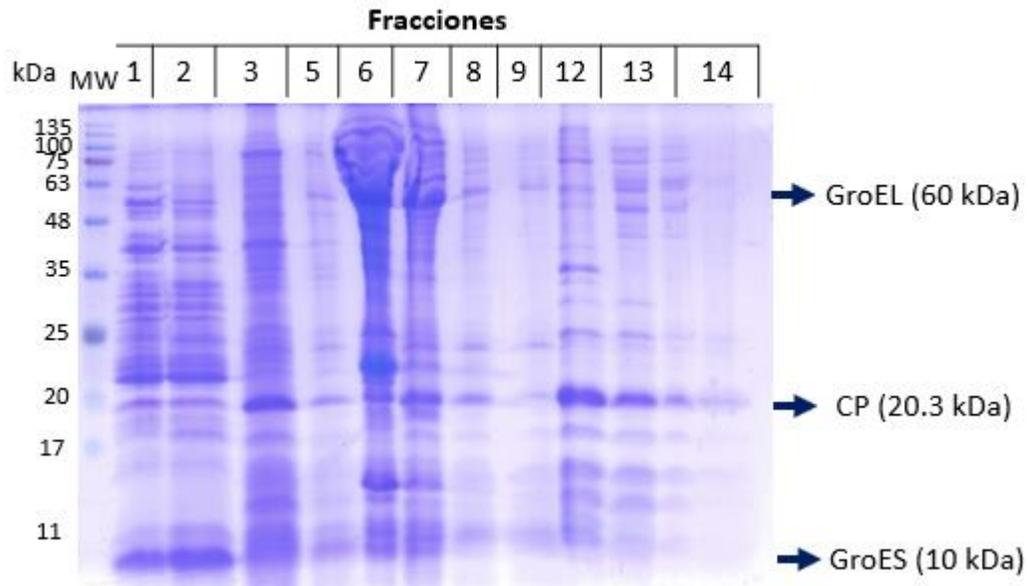
Los mejores resultados se obtuvieron con una concentración de 5 mM ATP-Mg<sup>2+</sup>, aumentando la separación de CP con GroES y GroEL. Las fracciones recolectadas (Figura 13C) contenían las proteínas esperadas; en las primeras fracciones se obtuvo CP, representando que la carga positiva proporcionada por su pI a pH 8 no permitió una interacción con la amina cargada de la matriz de poliestireno/divinilbenceno, caso contrario al complejo de chaperonas, las cuales interaccionaron con la matriz y su elución se obtuvo con una concentración de 0.5 M de NaCl (Figura 13B). Además de lo esperado, también se observó la presencia de CP sin el complejo de chaperonas en las fracciones 12 y 13 (Figura 13C). Por lo que, tanto las primeras fracciones (1,2 y 3) como 12 y 13, se recolectaron y juntaron para continuar con la purificación.



B)



C)



**Figura 13. Paso de purificación por cromatografía de intercambio iónico.** A) SDS-PAGE de las muestras procesadas para la columna aniónica. Carriles: MW) marcador de peso molecular; A, antes y D, después de la inducción; M, muestra tratada con 5 mM ATP-Mg<sup>2+</sup>; S, proteínas que se mantuvieron solubles; P, proteínas precipitadas después de la reacción de ATP-Mg<sup>2+</sup>. B) Cromatograma de la columna aniónica con la muestra de las proteínas solubles. C) SDS-PAGE de 30 µl de muestras de las fracciones correspondientes a los principales picos de absorbancia del cromatograma del panel B).

### 6.2.4 Ensamble de las proteínas de cápside.

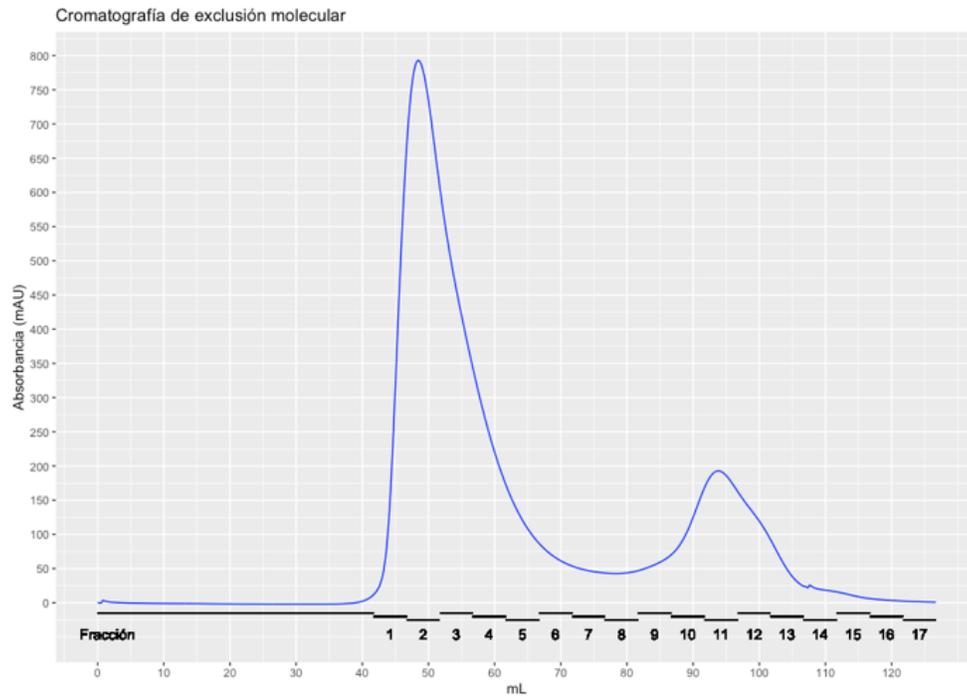
A partir de las fracciones 1-3, 12 y 13 obtenidas por la columna aniónica, donde se observa una reducción significativa de contaminantes, se pretendió aplicar la capacidad de CP para auto ensamblarse en VLPs. Por esta razón, la muestra se dializó contra amortiguador de desensamble (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 1 M, DTT 1 mM) con el propósito de asegurar la formación de dímeros, ya que no se sabe el estado de asociación de la CP, es decir, si se encuentra como monómero o dímeros hasta este paso de purificación. Las interacciones entre CP-CP son importante, debido a que son la principal unidad constructora de la cápside y a partir de estas interacciones se empiezan a formar lo pentámeros (Perlmutter & Hagan, 2015).

Al finalizar la diálisis de la muestra en amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 8 contra amortiguador de desensamble, la muestra se volvió a dializar contra amortiguador de ensamble (AcONa 53 mM, AcOH 47 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 100 mM, DTT 1 mM, pH 4.8). Durante los cambios de amortiguador y disminución de pH, la mayoría de las proteínas que estaban solubles en la muestra después de la cromatografía de intercambio aniónico, precipitaron. La muestra dializada se centrifugó y analizó mediante SDS-PAGE, observando que, efectivamente las condiciones de ensamble favorecieron mayoritariamente la solubilidad de CP causando la precipitación de otras proteínas.

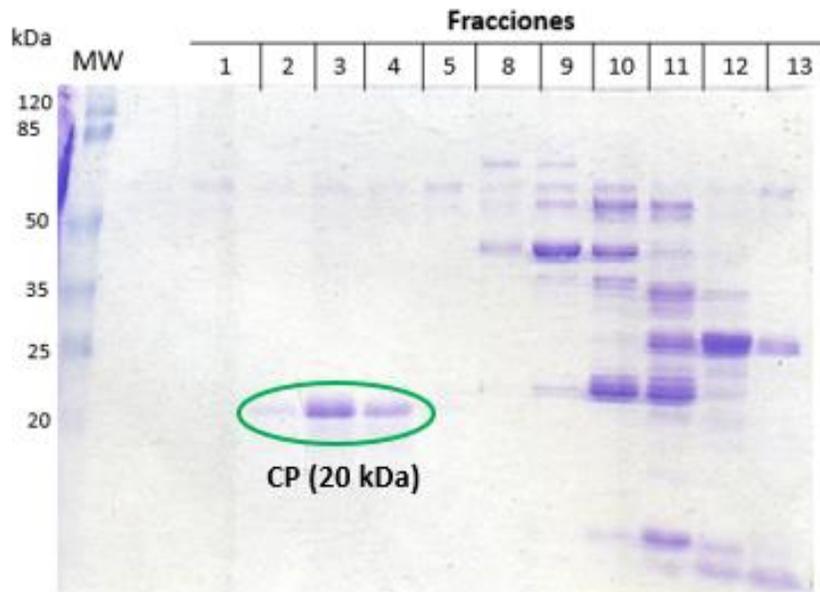
### **6.2.5 Cromatografía de exclusión molecular**

El último paso de purificación consistió en separar los agregados o ensamblados de CP de cualquier proteína presente en la muestra. Por lo que se utilizó la columna Superdex 200 GL 16/600. Obteniendo en el cromatograma un pico con mayor absorbancia entre el volumen de retención igual a 40-60 mL, representando la elución de una proteína en un estado de oligomerización, además de un segundo pico con menor absorbancia en un volumen mayor a 80 mL (Figura 14A). Todas las fracciones correspondientes a los dos picos de absorbancia se analizaron mediante SDS-PAGE, obteniendo principalmente como resultado la presencia de CP en la fracción 3 y 4. Mientras que en las fracciones 8-13, se observaron las proteínas que después de la disminución de pH se mantuvieron solubles (Figura 14B). Por los resultados obtenidos por SEC, se puede deducir que CP se purificó formando una estructura oligomérica, o posiblemente ensamblada por completo en una VLP. Para corroborar lo anterior, se evaluó el tamaño del agregado purificado y recolectado en las fracciones 3 y 4 en amortiguador de ensamble mediante DLS.

A)



B)

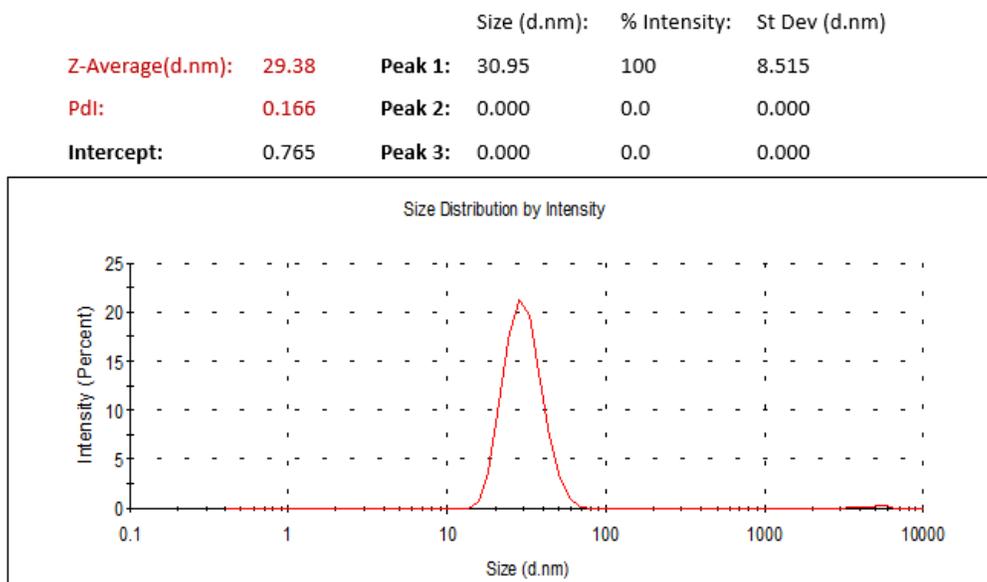


**Figura 14. Purificación de CP por cromatografía de exclusión molecular.** A) Cromatograma de la elución de proteínas por tamaños, observando un mayor pico de absorbancia en un volumen de retención entre 40-60 mL B) SDS-PAGE de las fracciones obtenidas por SEC. Carriles: MW) marcador de peso molecular, fracciones 3 y 4) correspondientes al pico con mayor absorbancia; fracciones 8-13) proteínas correspondientes al segundo pico de absorbancia

### 6.3 Análisis por DLS

La muestra de las fracciones 3 y 4, correspondientes a un posible ensamble purificado por cromatografía de exclusión molecular se evaluó mediante DLS para obtener su diámetro hidrodinámico. Obteniendo como resultado una sola población con un diámetro de 30.9 nm con una desviación estándar de  $\pm 8.5$  nm, un índice de polidispersidad de 0.166 y un valor de 0.765 para el intercepto, representando una muestra ligeramente polidispersa (Figura 15).

El diámetro hidrodinámico que se encontró para los ensambles de CP se encuentra dentro de los diámetros obtenidos para VLPs de BMV purificados de manera nativa. Los cuales, a pH 5.6, son de 29.1 (Strugała et al., 2017), y a pH 5.2 de 29.4 nm mediante DLS (Chen et al., 2008). Mientras que el diámetro del virión de BMV es de aproximadamente 28 nm (He et al., 2020). Dados los resultados, se puede sugerir que la CP purificada es capaz de autoensamblarse en estructuras con un diámetro similar a la cápside de BMV.



**Figura 15. DLS de las fracciones 3 y 4 obtenidos por SEC en amortiguador de ensamble (AcONa 53 mM, AcOH 47 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 100 mM, DTT 1 mM, pH 4.8)**

## 6.4 Ensayo de estabilidad de VLPs.

Al obtener la proteína de la cápside de BMV purificada y ensamblada con un diámetro hidrodinámico correspondiente a VLPs de BMV obtenidos de plantas infectadas como *Nicotiana benthamiana* y *Hordeum vulgare*, se procedió a evaluar la estabilidad de estas VLPs obtenidas por expresión heteróloga en *E. coli*. Por lo que, primero se estableció un diseño experimental que fuera capaz de evaluar y combinar los principales factores estabilizadores de la cápside, los cuales corresponden a pH, fuerza iónica y iones  $Mg^{2+}$ .

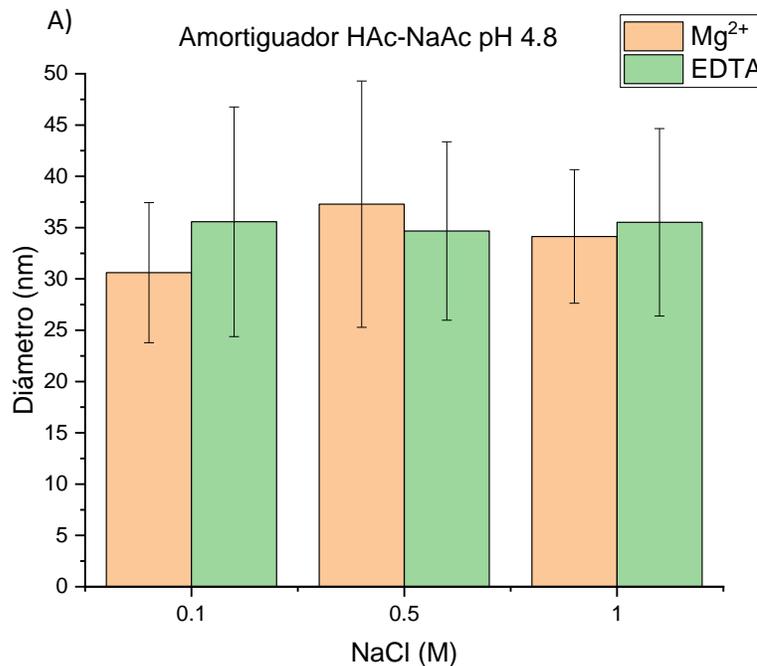
El diseño experimental incluyó pH 4.8, en el que las nanopartículas se encuentran ensambladas y estables; pH 5.6, un pH intermedio entre el ensamblaje y la expansión radial reversible de las partículas (hinchamiento), lo cual ocurre a pH 6.4; pH 7.5 en el que comienza el proceso de desensamblaje de las cápsides virales de BMV, y pH 8.4, donde se observa solo la presencia de dímeros. Además de los diferentes valores de pH, también se evaluó la fuerza iónica, ya que representa un papel importante en la estabilidad del virus. Desde 1974, cuando Pfeiffer y colaboradores comenzaron a estudiar el BMV y sus estados de agregación, se ha encontrado que entre pH 4 y 6 con una concentración de NaCl de 0.1-1.0 M se pueden encontrar cápsides completas. Mientras que a valores de pH mayores a 6 y concentración de 0.1-1.0 M de NaCl, mayoritariamente se observan estructuras incompletas de cápsides y/o subunidades de CP en forma de dímeros. Dado lo anterior se decidió evaluar concentraciones de 0.1, 0.5 y 1.0 M de NaCl. Finalmente, se añadió al diseño experimental la presencia y ausencia de  $Mg^{2+}$ . Debido a que los iones  $Mg^{2+}$  permiten aumentar la estabilidad de la interacción proteína-proteína cuando las cápsides virales se ensamblan sin la presencia de material genético, como en el caso de las VLPs (Lucas et al., 2002). Para evaluar la estabilidad de las VLPs sin la presencia de  $Mg^{2+}$ , se utilizó EDTA a una concentración de 10 mM. Quedando como resultado un diseño experimental con 30 condiciones a evaluar, representados en la tabla 6.

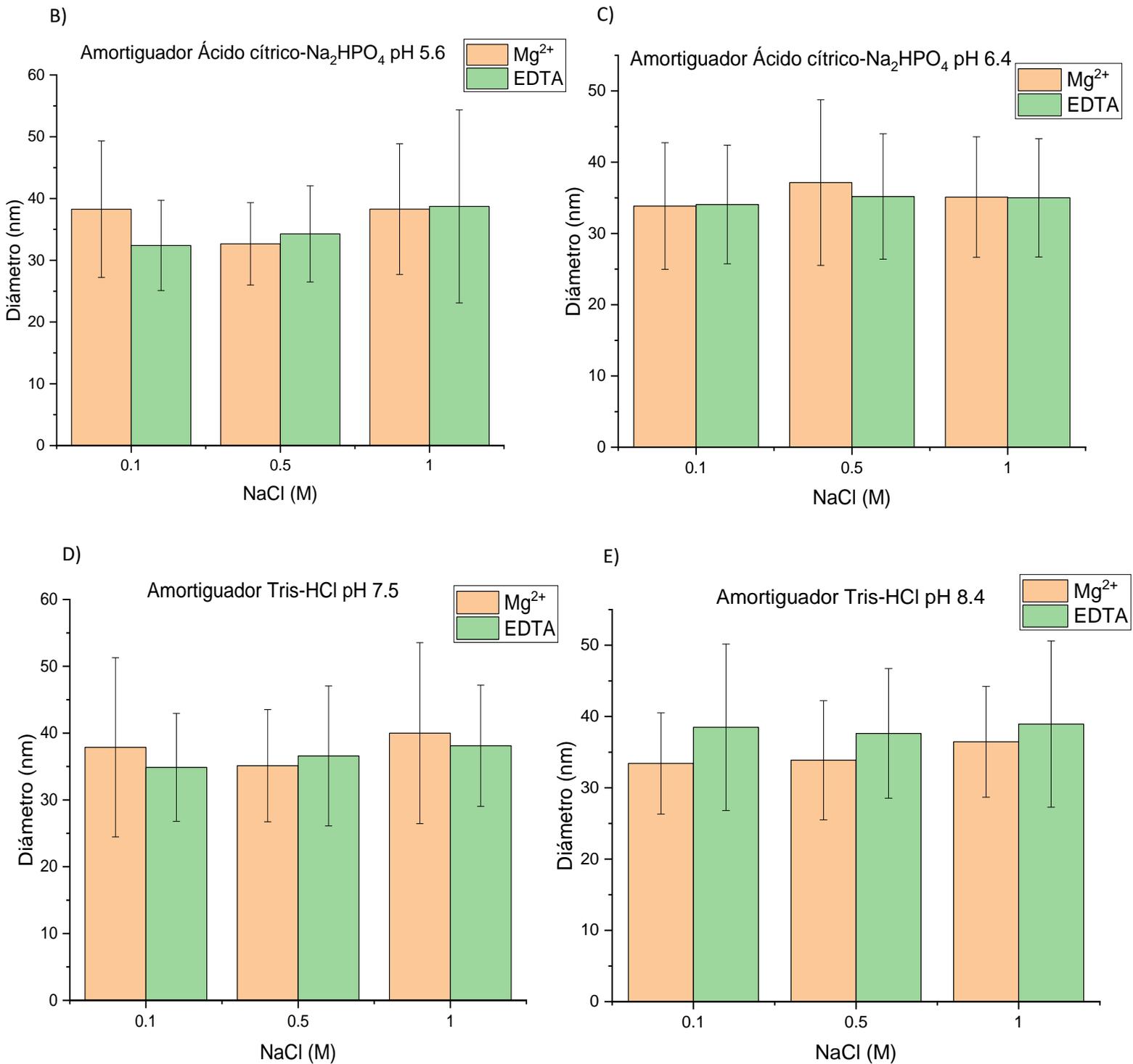
**Tabla 8.** Condiciones para evaluar la estabilidad de las VLPs de BMV.

**pH**

NaCl M	4.8		5.6		6.4		7.5		8.4	
	(ensamble)				(hinchamiento)				(desensamble)	
0.1	Mg <sup>2+</sup>	EDTA								
0.5	Mg <sup>2+</sup>	EDTA								
1.0	Mg <sup>2+</sup>	EDTA								

Las muestras con CP ensamblada se dejaron dializando durante 16 h contra los amortiguadores correspondientes a cada condición a analizar (Tabla 6). Al finalizar el tiempo de diálisis, las muestras se recuperaron, filtraron y analizaron mediante DLS para evaluar los cambios obtenidos en el diámetro hidrodinámico como consecuencia al cambio de amortiguador. Cada resultado de las condiciones de pH junto con las respectivas concentraciones de NaCl, Mg<sup>2+</sup> y EDTA se visualiza en la siguiente figura 16. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) realizando comparaciones entre las medias de las diferentes concentraciones de NaCl para cada grupo de pH a través una comparación múltiple mediante el método de Tukey utilizando el programa de estadística GraphPad Prism9.





**Figura 16. Gráficas de los diámetros hidrodinámicos por DLS obtenidos en el ensayo de estabilidad de las VLPs de BMV.** Evaluación en amortiguador a A) pH 4.8, B) pH 5.6, C) pH 6.4, D) pH 7.5 y E) pH 8.4, cada uno con concentraciones de 0.1, 0.5 y 1.0 M de NaCl, con Mg<sup>2+</sup> y EDTA.

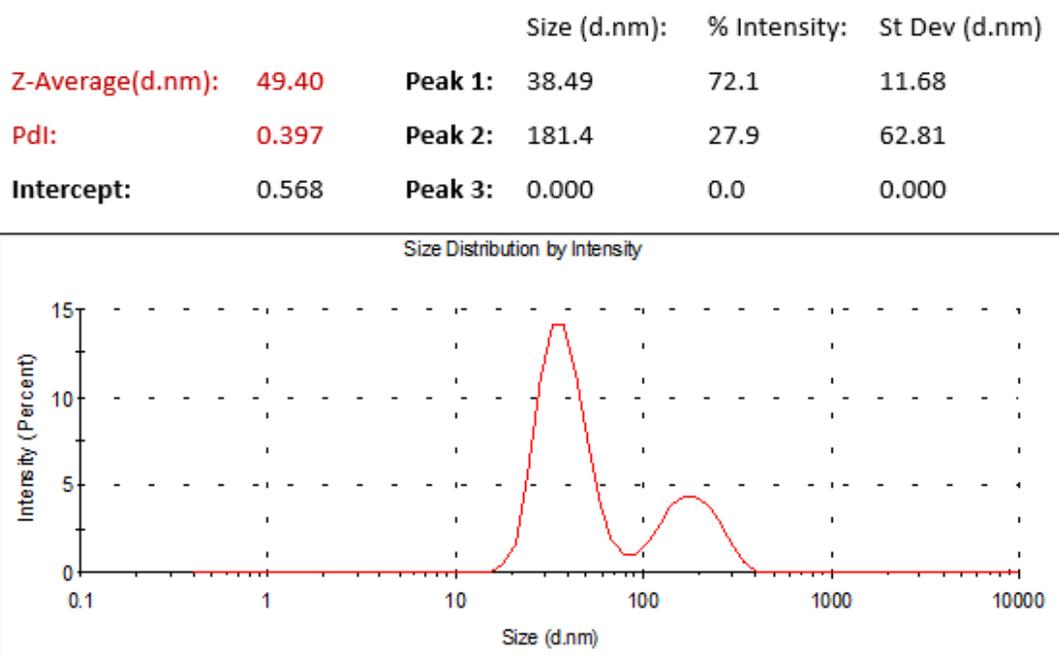
En la figura 16A se puede observar que en condiciones de pH 4.8 con  $Mg^{2+}$  el diámetro hidrodinámico de las VLPs se mantiene alrededor de 30 nm cuando se encuentran en concentraciones de 0.1 M de NaCl (condiciones consideradas como control). Este diámetro aumenta alrededor de 35 nm cuando la concentración de NaCl se encuentra en 0.5 y 1 M, mostrando diferencia significativa contra el control, con valores  $P < 0.0001$  y  $0.0172$ , respectivamente, sin cambios entre ambas concentraciones de NaCl. De manera similar, se observa que en pH 4.8 con la presencia de EDTA, el diámetro de las partículas se encuentra alrededor de 35 nm, en las tres concentraciones de NaCl, por lo que, de manera similar representan cambios significativos contra el control con valores  $P = 0.0012$  para 0.1 M,  $0.0008$  para 0.5 M y  $P < 0.0001$  para 1 M de NaCl.

En cuanto a pH 5.6 (figura 16B) con  $Mg^{2+}$  se observa que los diámetros son mayores a 35 nm con concentraciones de 0.1 y 1 M de NaCl, por lo que entre ambas condiciones no se presentan cambios. Caso contrario a concentraciones de 0.5 M de NaCl, donde el diámetro se mantiene alrededor de 30 nm y muestra diferencias contra 0.1 M con un valor  $P = 0.0213$  y para 1 M un valor  $P = 0.0006$ . En el caso de las muestras con EDTA, se observa un efecto de la concentración de NaCl, ya que el diámetro aumenta de 32, a 34 y finalmente a 36 nm, con el aumento de la concentración de NaCl. Sin embargo, no presentan diferencias significativas entre ellas.

En el pH del hinchamiento de las VLPs, pH 6.4 (figura 16C), se observa un diámetro de 37 nm como el diámetro más alto en presencia de  $Mg^{2+}$  con 0.5 M de NaCl. En cuanto a las condiciones con EDTA, se alcanzan diámetros alrededor de 35 nm para las tres concentraciones de NaCl. Para este pH de 6.4, no se encuentran diferencias entre los diámetros de las VLPs tanto para las muestras con  $Mg^{2+}$  como para las que contienen EDTA.

Finalmente, en las figuras 16D y 16E, correspondientes a pH 7.5 y 8.4. Se encontró que a pH 7.5 con presencia de  $Mg^{2+}$ , los diámetros se encuentran entre 35-37 nm, sin variación dentro de las concentraciones de NaCl. De manera similar a las condiciones en pH 5.6, se observa que con EDTA, el NaCl presenta un efecto

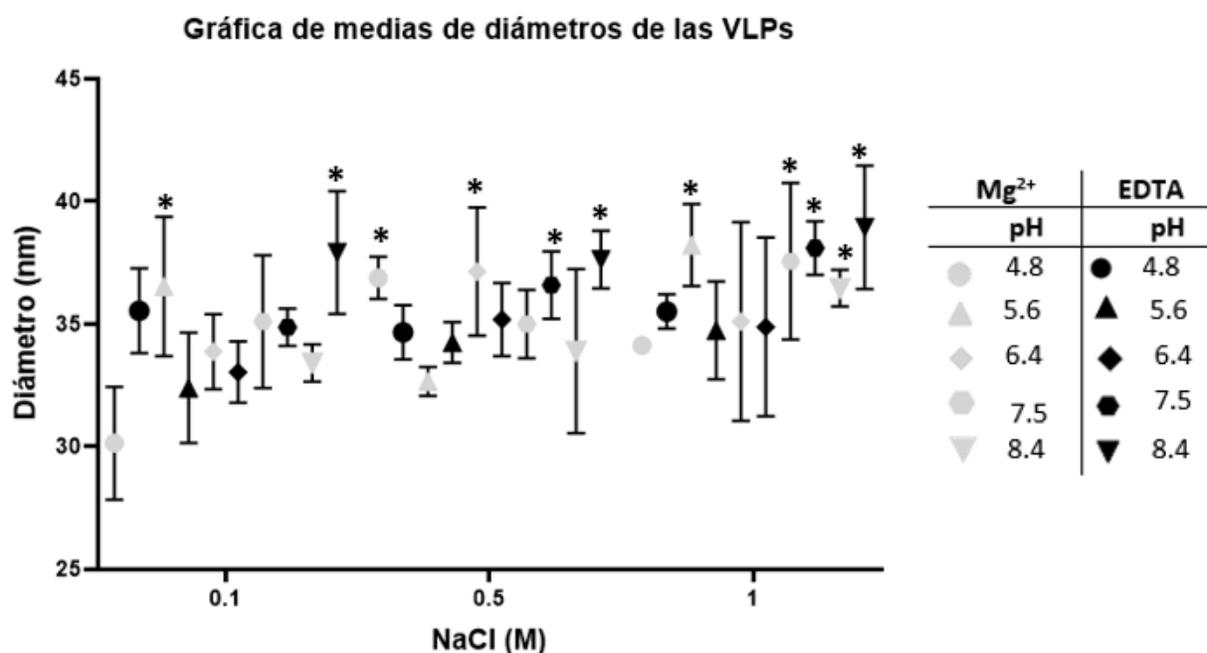
que relaciona el aumento de su concentración con el aumento en el valor del diámetro, alcanzando un valor de 38 nm con 1.0 M de NaCl. Este valor de diámetro entre 38-39 nm se mantiene a pH 8.4 con EDTA a 0.1, 0.5 y 1.0 M de NaCl. Además, a pH 8.4, se observa una nueva población de partículas con tamaños alrededor de 180 nm (Figura 17).



**Figura 17. Análisis por DLS de ensamblés en pH 8.4, 0.1 M de NaCl y 10 mM EDTA.**

A partir de estos datos obtenidos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa de estadística GraphPad Prism 9, para evaluar las diferencias significativas entre los diámetros obtenidos después de someter las VLPs a diferentes condiciones de pH, concentración de NaCl,  $Mg^{2+}$  y EDTA. Los resultados del ANOVA mostraron que las 3 variables contaban con un valor  $P < 0.005$ , indicando la presencia de diferencias. Posteriormente, se realizaron comparaciones entre las medias de cada una de las condiciones contra la media de la condición control (amortiguador en pH 4.8 con 0.1 M de NaCl y 10 mM de  $Mg^{+2}$ ). Para ello se realizó una comparación múltiple mediante el método de Dunnett.

En los resultados obtenidos (Figura 18) se representa la gráfica de medias de los diámetros para las 29 condiciones evaluadas, al igual que la media para la condición control. En ella se puede observar una variación de diámetros de 33-39 nm, con condiciones en la cuales esta variación de diámetro es más significativa (\*) con valor  $P < 0.0001$ , como es el caso del amortiguador a pH 5.6 con 0.1 M de NaCl y  $Mg^{2+}$  o el amortiguador a pH 8.4 con 0.1 M de NaCl y EDTA, donde los diámetros de las VLPs alcanzan valores de 36.5 y 37.0 nm, respectivamente. Encontrando como máximo valor de diámetro y diferencia con respecto al diámetro control, la condición con pH 8.4, 1 M de NaCl y EDTA, con un diámetro de la VLP de 39 nm.



**Figura 18. Gráfica de las medias de diámetros de las VLPs a diferentes condiciones de pH, concentración de NaCl con  $Mg^{2+}$  y EDTA.** Se observan las medias y desviación estándar para cada una de las 30 condiciones analizadas por comparación múltiple mediante el método de Dunnett. Las condiciones con mayor diferencia significativa (valor  $P < 0.0001$ ) con respecto a la condición control se marcan con un \* en la parte superior.

En la tabla 10, se observan todas las condiciones en las cuales se obtuvo un valor  $P < 0.005$  o diferencia significativa para el análisis mediante el método de Dunnett. En dicha tabla se destaca la importancia de la concentración de NaCl al igual que la presencia de EDTA, ya que para el caso de la concentración 0.1 M de NaCl, se encontraron diferencias solo para el pH de 5.6 y 7.5 con  $Mg^{2+}$ . Mientras que para las muestras con EDTA, presentaron cambios aun en valores de pH de 4.8, además de 7.5 y 8.4. Esta cantidad de condiciones con diferencias significativas fue aumentando en relación con la concentración de NaCl, ya que en el caso de las muestras en  $Mg^{2+}$  con 0.5 M de NaCl, se encontraron 3 condiciones, y para 1 M de NaCl, todos los valores de pH presentaron diferencias significativas. En cuanto a las muestras con EDTA, se observó que la alteración del diámetro de las VLPs se obtiene a partir de 0.5 M de NaCl para todos los valores de pH (4.8-8.4).

Estos resultados, representan la importancia tanto del NaCl como de la presencia del  $Mg^{2+}$ , ya que las condiciones que contenían este catión presentaron menos diferencias en comparación a las condiciones que contenían EDTA, en las que a partir de pH 4.8 se presentaron alteraciones en el diámetro hidrodinámico de las VLPs. Encontrando que el tamaño de las partículas obtenidas tiene determinantes multifactoriales, en este caso el pH, fuerza iónica y la presencia de iones divalentes, presentando la capacidad de alterar la interacción entre capsómeros y como consecuencia el radio hidrodinámico global de la partícula, como se ha visto desde los primeros estudios de la estabilidad de BMV (Pfeiffer et al., 1976; Lucas et al., 2002). Sin embargo, pesar de los cambios observados entre condiciones, no se encontró diámetros de menor tamaño que podría representar la presencia de estructuras más simples como dímeros o capsómeros, como se esperaba, ya que se ha reportado que en valores mayores a pH 7, se lleva a cabo el desensamble de las VLPs de BMV, por lo que fue importante evaluar la integridad de estas partículas.

**Tabla 10.** Tabla comparativa de las condiciones con diferencia significativa

NaCl	Mg <sup>2+</sup>		EDTA	
	pH	Valor P ajustado	pH	Valor P ajustado
0.1	5.6*	<0.0001	4.8	0.0012
	7.5	0.0041	7.5	0.0076
			8.4*	<0.0001
0.5	4.8 *	<0.0001	4.8	0.0127
	6.4 *	<0.0001	5.6	0.0332
	7.5	0.0055	6.4	0.0034
			7.5*	<0.0001
			8.4 *	<0.0001
1	4.8	0.0429	4.8	0.0013
	5.6 *	<0.0001	5.6	0.0105
	6.4	0.0042	6.4	0.0074
	7.5*	<0.0001	7.5 *	<0.0001
	8.4 *	<0.0001	8.4 *	<0.0001

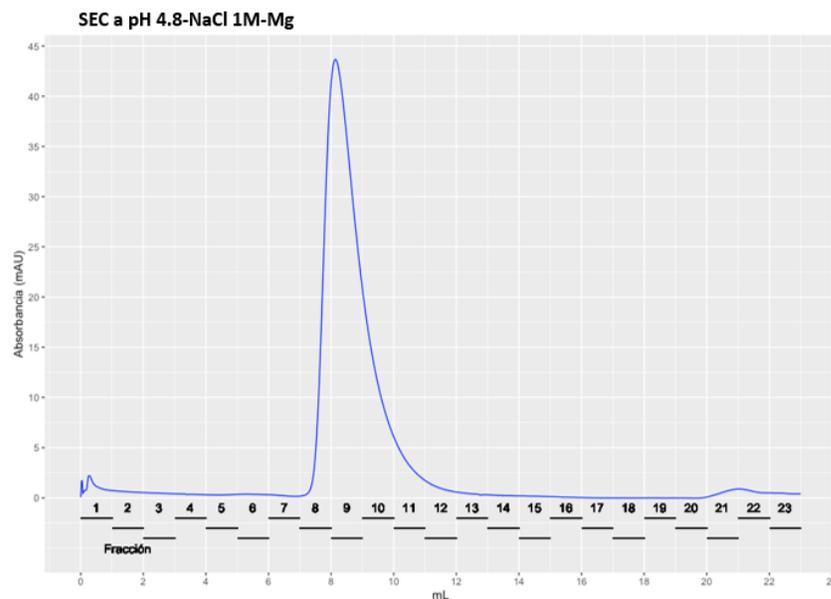
### 6.4.1 Cromatografía de exclusión molecular para el ensayo de estabilidad

Después de analizar los resultados anteriormente obtenidos por DLS y observar diferencias en los diámetros de las VLPs sin grandes cambios en las VLPs, aun en las condiciones en las que se esperaba desensamble de las partículas, se decidió corroborar la integridad de estas VLPs. Para ello, se utilizó la columna de exclusión molecular Superdex 200 GL 10/300 y se eligieron las siguientes 6 condiciones con los parámetros más significativos:

- 1) pH 4.8 con concentración de NaCl 1.0 M con MgCl<sub>2</sub> 10 mM
- 2) pH 4.8 con concentración de NaCl 1.0 M con EDTA 10 mM
- 3) pH 6.4 con concentración de NaCl 0.5 M con MgCl<sub>2</sub> 10 mM
- 4) pH 6.4 con concentración de NaCl 0.5 M con EDTA 10 mM
- 5) pH 8.4 con concentración de NaCl 0.1 M con MgCl<sub>2</sub> 10 mM
- 6) pH 8.4 con concentración de NaCl 0.1 M con EDTA 10 mM

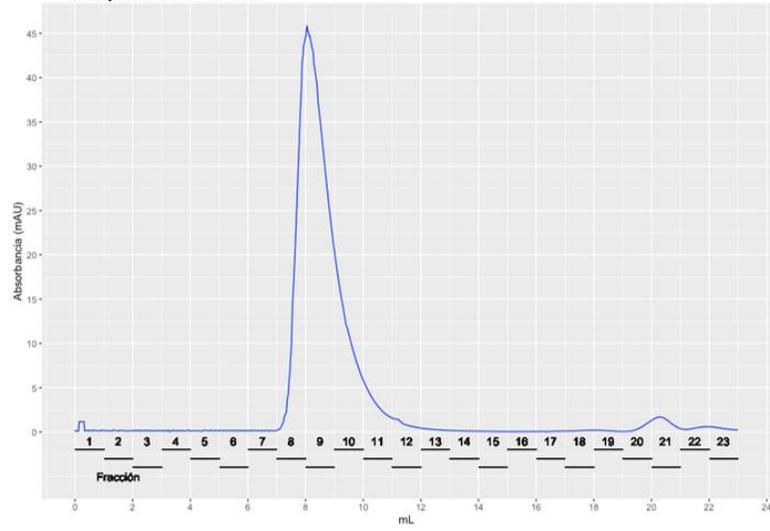
En la figura 19 se observan los cromatogramas de las 6 condiciones analizadas, y se encuentra que, para todos los casos, el perfil de elución de las partículas se representa con un pico de mayor absorbancia en un volumen de retención entre 7-10 mL, correspondiente con el volumen muerto de 8 mL, representando estructuras de mayor tamaño, sin cambios significativos entre cada condición. Con los resultados obtenidos, se puede sugerir que estas nanopartículas de BMV obtenidas por expresión heteróloga en *E. coli* presentan una alta estabilidad frente a diferentes valores de pH, concentración de NaCl, y presencia o ausencia de Mg<sup>2+</sup>. Sin embargo, esta alta estabilidad no corresponde totalmente a la que presentarían estructuras como VLPs, ya que al carecer de material genético también carecen de la interacción entre su RNA-proteína, por lo que la estabilidad para VLPs solo estaría dada por interacciones entre proteína- proteína. No obstante, la alta estabilidad e integridad ya ha sido observada anteriormente en viriones de BMV, donde en condiciones de pH 7.4 y 8.4, las cápsides alcanzan un diámetro de 30.99 y 31.08 nm, respectivamente (Strugała et al., 2017).

A)



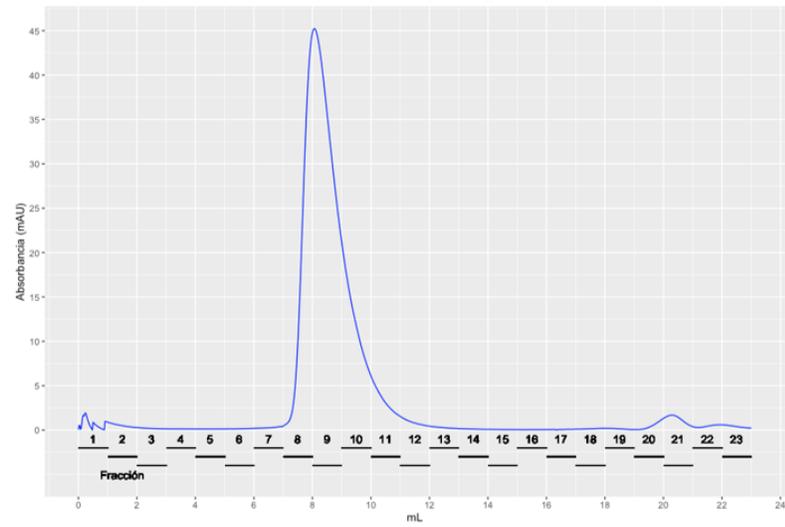
B)

SEC a pH 4.8-NaCl 1M-EDTA



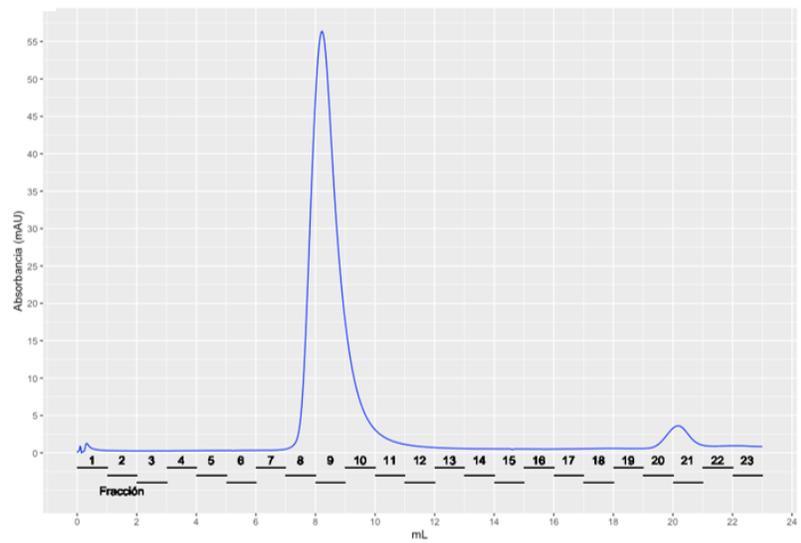
C)

SEC a pH 6.4-NaCl 0.5M-Mg

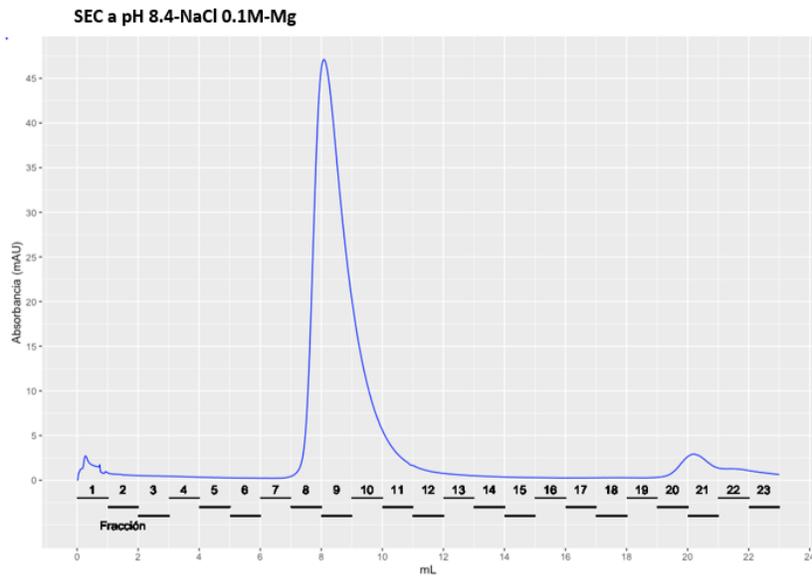


D)

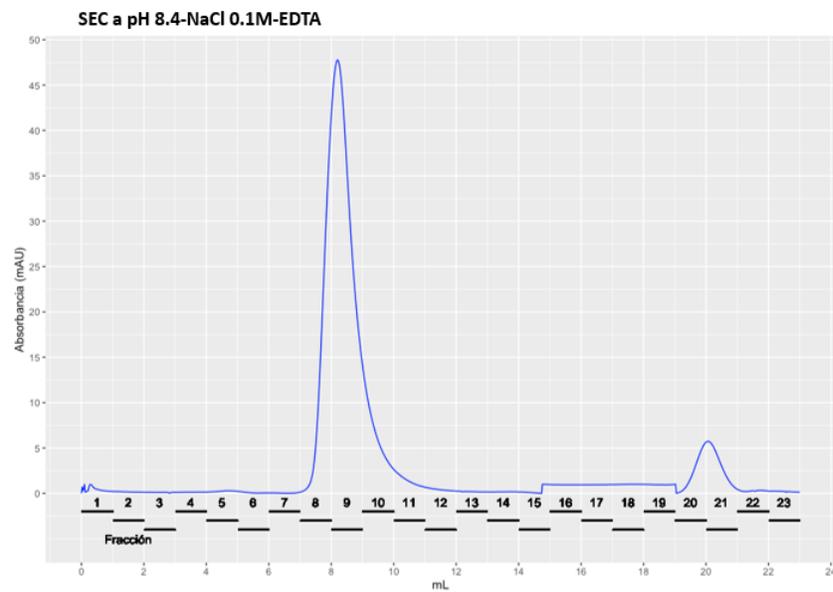
SEC a pH 6.4-NaCl 0.5M-EDTA



E)



F)



**Figura 19. Perfiles de elución de la cromatografía de exclusión molecular para evaluar integridad de ensamblés.** Condiciones de pH 4.8 con concentración 1.0 M NaCl con A)  $MgCl_2$  y B) EDTA; pH 6.4 con concentración 0.5 M NaCl con C)  $MgCl_2$  y D) EDTA; pH 8.4 con concentración de NaCl 0.1 M con E)  $MgCl_2$  y F) EDTA

## 6.5 Interacción de ácidos nucleicos de *E. coli* y proteína de cápside

Como consecuencia de los anteriores resultados, se pretendió analizar la razón de la alta estabilidad de las nanopartículas. Se planteó la hipótesis de que la estabilidad estaba dada por interacciones entre la proteína de cápside y los ácidos nucleicos de *E. coli*. Para analizar la presencia de RNA o DNA en los ensamblajes de CP, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1% con las fracciones 3 y 4 obtenidas por SEC, las cuales ya se encontraban purificadas y caracterizadas mediante DLS con un diámetro hidrodinámico alrededor de 30 nm. El gel de agarosa se tiñó con bromuro de etidio para detectar cualquier ácido nucleico presente en el ensamble.

Lo que se observó después de teñir y visualizar el gel fue que tanto la fracción 3 como la 4, presentaban cierta cantidad de ácidos nucleicos a la misma altura del gel (Figura 20), con lo que se podría suponer que las proteínas de cápside habían interactuado con los ácidos nucleicos de *E. coli* en algún paso de la purificación, y probablemente lo estaban encapsulando, siendo la explicación a la estabilidad de las VLPs.

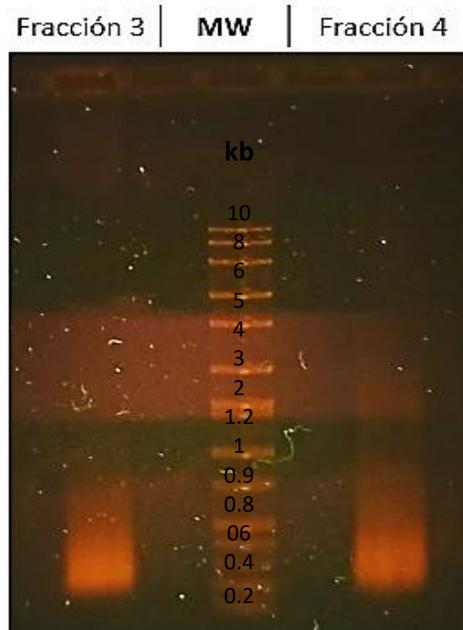
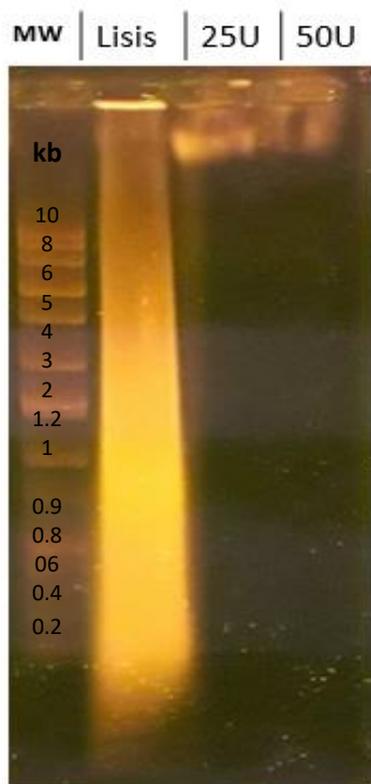


Figura 20. Gel de agarosa de VLPs.

### 6.5.1 Degradación de ácidos nucleicos de *E. coli*

Con el objetivo de evitar la interacción entre los ácidos nucleicos y la CP, se intentó degradar la mayor cantidad de material genético presente en la muestra después de la lisis celular (Figura 21, carril lisis). Por lo que, la muestra con proteínas solubles en amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 8, se trató con 25 y 50 unidades (U) de la enzima benzonasa, la cual es una endonucleasa genéticamente modificada de *Serratia marcescens* que es capaz de digerir RNA y DNA de cadena simple, doble, lineal y circular a oligonucleótidos.



La visualización de la cantidad de ácidos nucleicos degradados y presentes en la muestra para ambas concentraciones de enzima (25 y 50 U) se analizó mediante un gel de agarosa al 1% (Figura 21), en el que se observa que a partir de la adición de 25 U de benzonasa en la muestra, se degrada la mayor cantidad de material genético presente después de la lisis celular (Figura 21, carril lisis). Esta cantidad de unidades de enzima y condiciones de reacción, adición de 1.5 mM de  $Mg^{2+}$ , reaccionando por 20 min a 37° C con agitación orbital de 300 rpm, fueron utilizadas para la degradación de ácidos nucleicos en los siguientes experimentos.

**Figura 21. Gel de agarosa para la degradación de ácidos nucleicos.**  
Carriles: Lisis) muestra de lisis antes de la adición de benzonasa; 25U) muestra tratada con 25 unidades de enzima, y 50U) muestra con 50 unidades de enzima.

## 6.5.2 Cromatografía de intercambio aniónico de muestra tratada con benzonasa

Después de obtener y tratar la muestra con las unidades de benzonasa necesarias para degradar la mayor cantidad de ácidos nucleicos, se continuó con el protocolo ya establecido para la purificación de CP. Así que, al finalizar el tiempo para la reacción de la enzima, se realizó la separación de CP del complejo de chaperonas GroEL-GroES con la adición de ATP-Mg<sup>2+</sup> 5 mM y su posterior análisis por la columna de intercambio aniónico.

En la figura 22A se observa el cromatograma obtenido para la muestra analizada, en el que se obtiene un claro cambio en el perfil de elución de las proteínas, ya que el pico de absorbancia correspondientes a las proteínas que no interacciona con la matriz de la columna aniónica (primeras fracciones) aumenta considerablemente en comparación con el pico de absorbancia obtenido cuando la muestra no es tratada con benzonasa (Figura 13B). Caso contrario en el pico representante de las proteínas que eluyen con 1 M de NaCl (fracciones 12-13), en el cual disminuyó la absorbancia obtenida con respecto a la muestra que no es tratada con benzonasa (Figura 13B). Mientras que el pico de absorbancia correspondiente a la elución del complejo de chaperonas se mantuvo sin cambios.

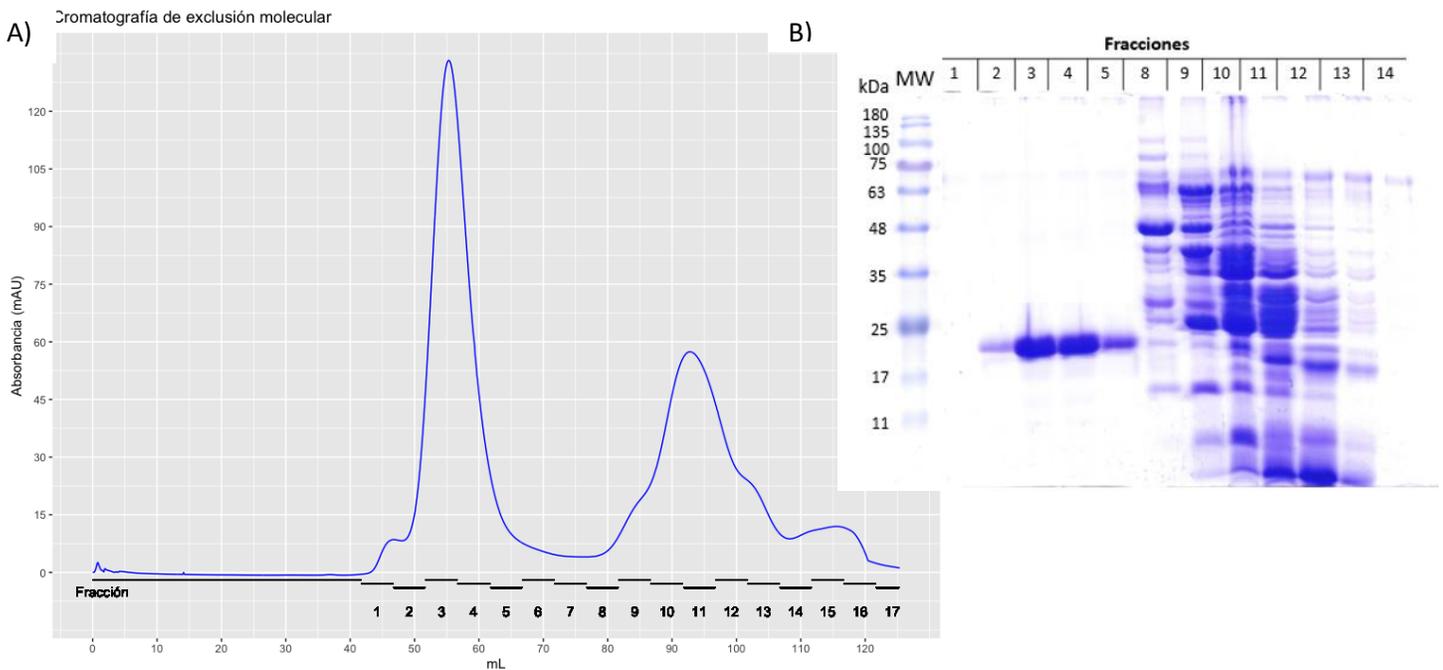
Al analizar las fracciones representantes de los picos de absorbancia mediante SDS-PAGE (Figura 22B), se observa un aumento significativo en las fracciones 1 y 2 de CP y una disminución de esta proteína en las fracciones 12-13, fracciones en las que se observaba presencia mayoritaria de CP cuando la muestra no es tratada con benzonasa (Figura 13C). En consecuencia, se consideró que posiblemente esta retención de CP en la columna se estaba dando por la interacción entre la carga negativa de los ácidos nucleicos y la carga positiva de la matriz de la columna aniónica. Por esta razón, en la muestra que presenta degradación de material genético, hay una disminución en la cantidad de CP presente en las fracciones 12 y 13.



### 6.5.3 Cromatografía de exclusión molecular de muestra tratada con benzonasa

Después de la purificación de CP por medio de la columna de intercambio aniónico, se recolectaron las fracciones 1 y 2 en amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 8 y se dializó contra amortiguador de desensamble (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 1 M, DTT 1 mM) durante 12 h. Al finalizar el tiempo, se volvió a dializar contra el amortiguador de ensamble (AcONa 53 mM, AcOH 47 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 100 mM, DTT 1 mM, pH 4.8) durante 24 h.

Después de la diálisis para la formación de ensambles, la muestra se aplicó a la columna Superdex 200 GL 16/600. Se obtuvo el perfil de elución mostrado en la figura 23A, con un pico de absorbancia en el volumen 50-65 mL de retención de la columna, este pico se encuentra más definido que el observado en el cromatograma de los ensambles de la muestra sin tratar con benzonasa. Al analizar las fracciones recolectadas durante la purificación mediante SDS-PAGE al 12.5 % (Figura 23B), se observa que las fracciones 3 y 4 contienen la mayor cantidad de CP, correspondiente con los resultados anteriormente obtenidos.



**Figura 23. Cromatografía de exclusión molecular para la muestra tratada con benzonasa.** A) Perfil de elución de proteínas por SEC. B) SDS-PAGE al 12.5% de las fracciones correspondientes a cada pico de absorbancia.

## 6.5.4 Análisis por DLS

Después de obtener a la proteína purificada mayoritariamente en las fracciones 3 y 4, se analizó el diámetro hidrodinámico de los ensamblajes resultantes al tratamiento con benzonasa. En la figura 24, se observa la presencia de una sola población de partículas con diámetro alrededor de 31.98 nm con una desviación estándar de  $\pm 6.6$  nm, índice de polidispersidad bajo, 0.06, y un valor para el intercepto de 0.868. Tales datos, indican que las partículas obtenidas son más monodispersas. Sin embargo, el resultado obtenido presenta una amplia similitud con los valores recolectados anteriormente para la muestra que no es tratada con benzonasa.

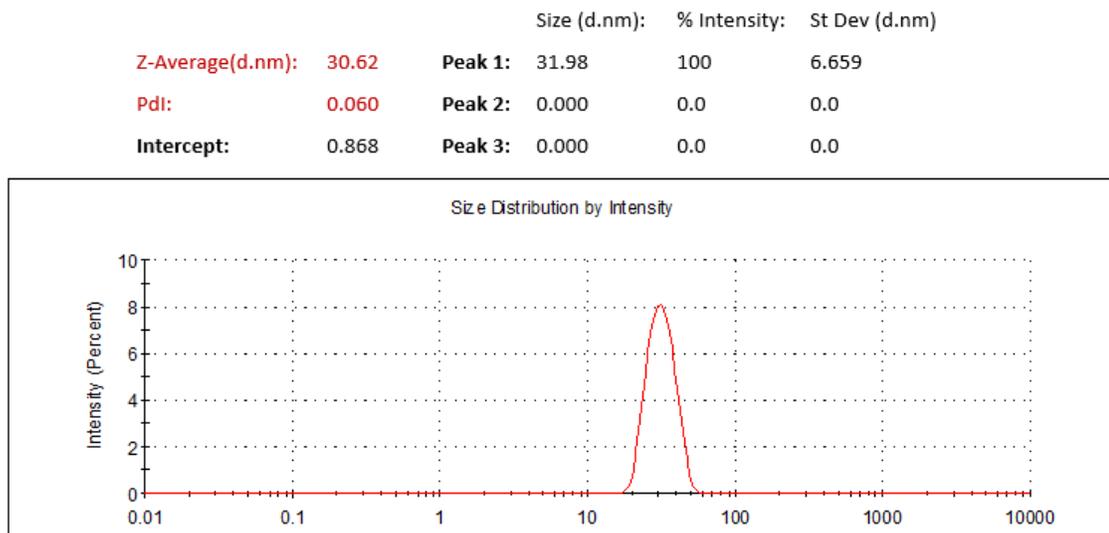


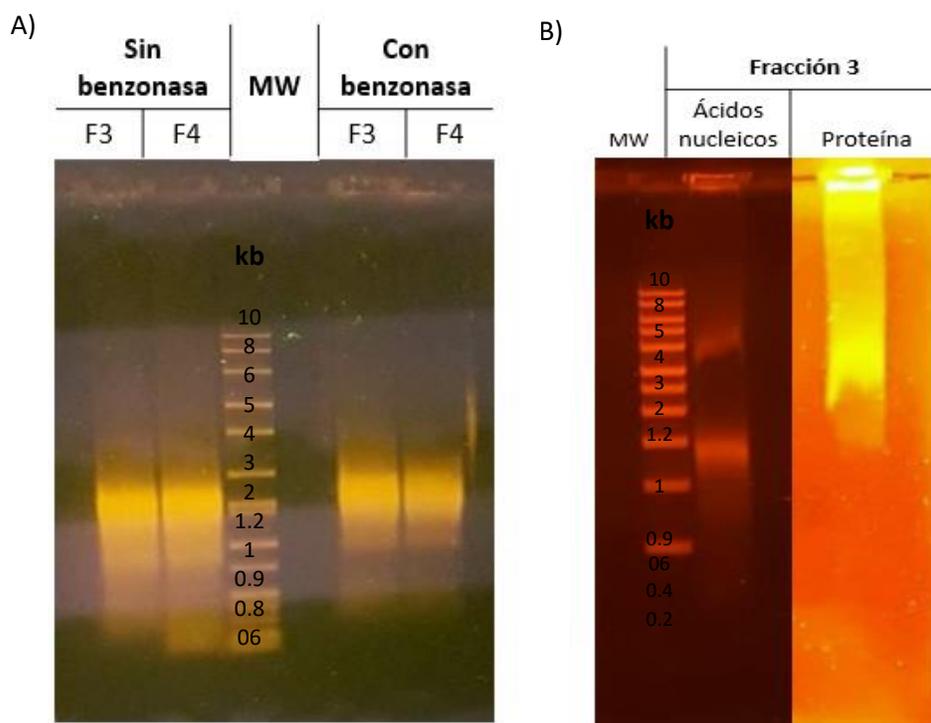
Figura 24. Análisis por DLS de los ensamblajes obtenidos por SEC para la muestra tratada con benzonasa.

## 6.5.5 Tinción de proteína en gel de agarosa

Después de obtener los ensamblajes de CP con la muestra tratada desde la lisis celular con benzonasa, se analizaron las mismas fracciones 3 y 4 en gel de agarosa al 1% para verificar el estado de los ensamblajes en relación con los ácidos

nucleicos presentes o no. En la figura 25A se observa que a pesar de intentar degradar la mayor cantidad de RNA y DNA, sigue existiendo una interacción entre este material y la proteína de cápside que le permite ensamblarse en partículas con un diámetro alrededor de 30 nm. Para corroborar dicha interacción, se realizó un gel de agarosa con una muestra de CP purificada y ensamblada, esta muestra se analizó por duplicado para teñir tanto los ácidos nucleicos como la proteína.

La tinción de proteína en el gel de agarosa se llevó a cabo mediante la tinción fluorescente de SYPRO Ruby y se observó por medio del transiluminador UV (Figura 25B). La tinción de ácidos nucleicos se presenta tanto en el pozo (parte superior) como en la parte media del gel, además se observa un ligero hueco que de manera similar corresponde al espacio teñido con SPRO Ruby para la proteína, dando también señal de proteína en el pozo donde se colocó la muestra. Lo que podría representar ensamblajes que no entraron totalmente al gel de agarosa y por tanto dan señal tanto de proteína como de ácidos nucleicos. Consecuentemente, se puede sugerir que sí existe una interacción/ensamble de ácidos nucleicos con la proteína de cápside, permitiéndole presentar alta estabilidad y formación de partículas con un diámetro similar a los viriones nativos de BMV.



**Figura 25. Gel de agarosa al 1% para los ensamblajes de BMV.** A) Tinción de ácidos nucleicos para las fracciones 3 y 4 de las muestras tratadas con y sin benzonasa. B) Tinción de ácidos nucleicos y proteína del ensamble obtenido en el tratamiento con benzonasa

## 6.6 Estudio del ensamble de CP en *E. coli*

Después de los resultados obtenidos en el tratamiento de la muestra con benzonasa, se decidió analizar si las partículas de BMV se encontraban ensambladas antes de la lisis celular. Por lo que, mediante la columna de exclusión molecular Superdex 200 GL 16/600, se intentó separar las proteínas solubles después de la lisis celular. Al finalizar la corrida, las fracciones recolectadas se analizaron por SDS-PAGE al 12.5% (Figura 26A) y se observó que tanto el complejo de chaperonas GroEL-GroES como CP, se encontraban mayoritariamente dentro de las primeras fracciones (fracción 1-4) como se ha obtenido en el protocolo de purificación. Sin embargo, en estas primeras fracciones también se observó la presencia de muchas otras proteínas contaminantes. A pesar de ello, se intentó analizar la fracción 3 por DLS (Figura 26B) y se encontraron dos poblaciones con un diámetro hidrodinámico alrededor de 25 y 165 nm.

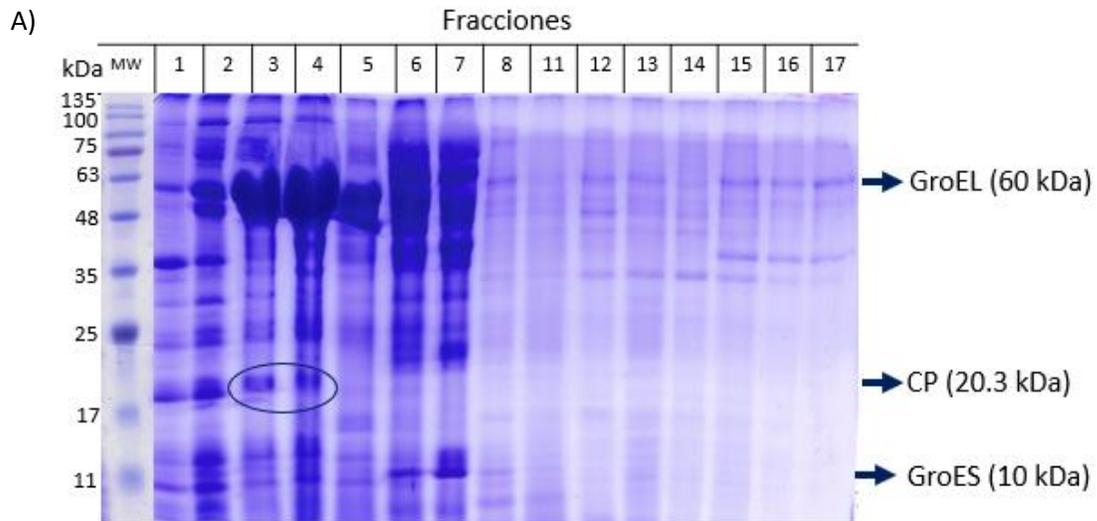
Al no obtener una separación adecuada de CP para observar su estado de oligomerización después de la lisis celular, se planteó continuar con el protocolo de purificación ya establecido. Por lo que, la muestra obtenida después de la lisis celular se dializó contra amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 8, se trató con benzonasa, después se le añadió 5 mM de ATP-Mg<sup>2+</sup>, al final la muestra se aplicó a la columna de intercambio aniónico. Las primeras fracciones, 1 y 2, se recolectaron y concentraron para ser analizadas por SEC en la columna Superdex 200 GL 16/600, ya que estas primeras fracciones corresponden a las proteínas que no interactúan con la matriz de la columna y que, además, contiene mayoritariamente CP sin el complejo de chaperonas.

Las fracciones recolectadas durante el análisis por SEC se observaron por SDS-PAGE al 12.5% (Figura 27A). Se obtuvo que, de manera similar a los casos anteriores, CP se encontró en las fracciones 2, 3 y 4. Estas fracciones se observaron sin tantas proteínas contaminantes y principalmente la presencia de chaperonas disminuyó considerablemente. La fracción 3 se analizó por DLS (Figura 27B), encontrando 2 poblaciones, una con un diámetro hidrodinámico de 30 nm y otra de

203 nm. El primer diámetro corresponde al tamaño encontrado de los ensamblados purificados anteriormente (Figura 15 y 24). A pesar de que, en este paso de purificación, la muestra no se dializó contra amortiguador de desensamble ni de ensamble, la muestra se encuentra solo en un amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 8 y sin NaCl y presenta partículas con un diámetro de 30 nm.

Con estos resultados y los obtenidos en las muestras tratadas con benzonasa, se puede suponer que el ensamble de CP se puede llevar a cabo de manera *in vivo* en *E. coli* y que, además, es capaz de encapsular material genético huésped. Resultado que es similar a los datos obtenidos para la sobreexpresión de la proteína de cápside del CCMV, en un sistema hospedero como *Pichia pastoris*. En el cual, se obtuvo la proteína soluble y ensamblada, dentro de la cápside se encontró la presencia de RNA, principalmente RNA huésped y RNA de CP como componente menor. En el mismo estudio, realizaron una delección de 34 aminoácidos correspondientes al N-terminal; al purificar esta CP, encontraron que las proteínas eran capaces de expresarse de manera soluble y sin presentar interacción con el RNA huésped (Brumfield et al., 2004).

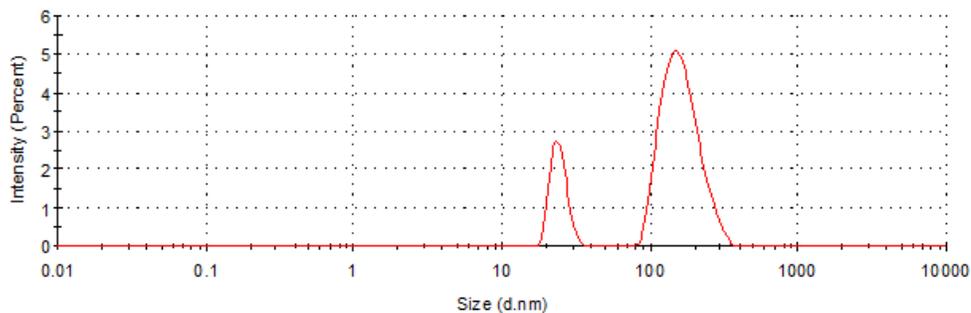
Phelps y colaboradores, en el 2007, utilizaron *Pseudomonas fluorescens*, como sistema huésped para la producción de CP de CCMV, en este sistema determinaron que las VLPs producidas principalmente encapsulaban diferentes mRNA del huésped y mRNA de CCMV de CP. El ARN, se empaquetaba de manera limitada por una distribución espacial de los ARN en la célula, ya que, el RNA huésped, correspondía con el tamaño del RNA nativo, encapsulando productos con un tamaño de 600 y 400 nucleótidos.



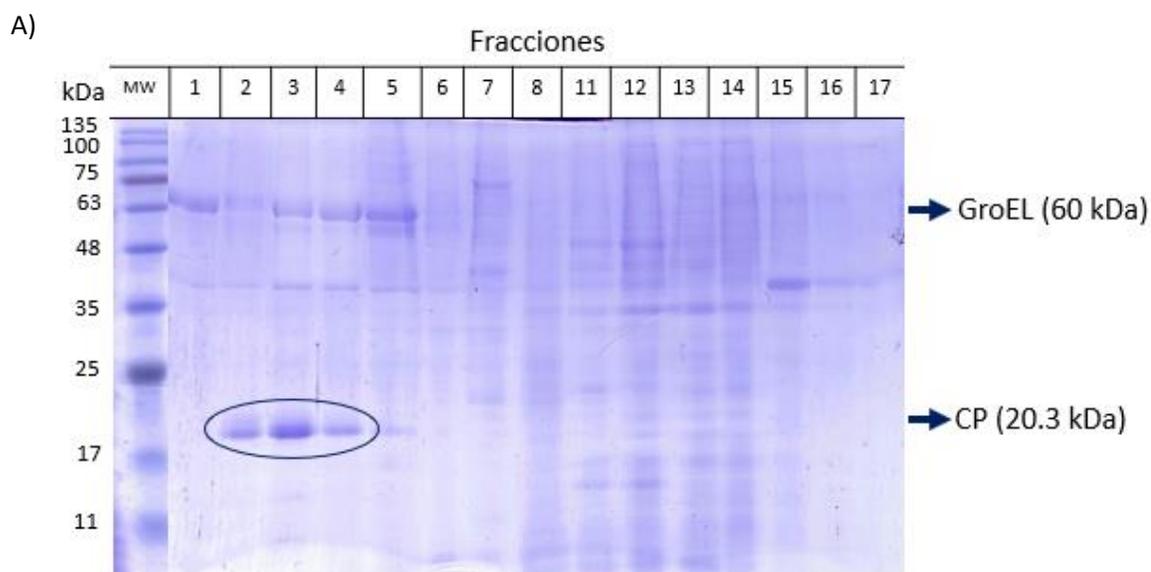
B)

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm)
<b>Z-Average(d.nm):</b> 88.32	<b>Peak 1:</b> 165.5	80.5	48.25
<b>Pdl:</b> 0.527	<b>Peak 2:</b> 24.35	19.5	3.075
<b>Intercept:</b> 0.869	<b>Peak 3:</b> 0.000	0.0	0.000

Size Distribution by Intensity

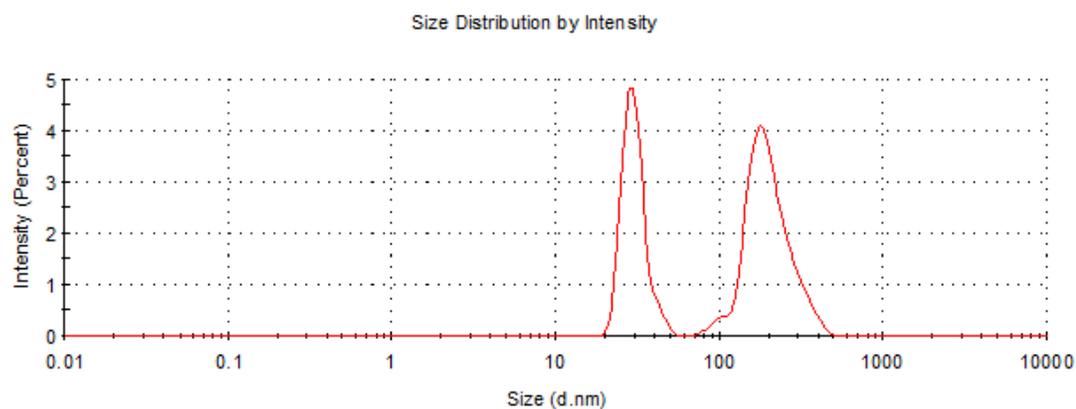


**Figura 26. Cromatografía de exclusión molecular para la muestra después de la lisis celular.**  
 A) SDS-PAGE al 12.5 % de las fracciones recolectadas durante la purificación. B) Análisis por DLS de la fracción 3 obtenida por SEC



B)

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm)
<b>Z-Average(d.nm):</b>	<b>81.06</b>	<b>Peak 1:</b> 203.7	59.4
<b>Pdl:</b>	<b>0.627</b>	<b>Peak 2:</b> 30.25	40.6
<b>Intercept:</b>	0.704	<b>Peak 3:</b> 0.000	0.0

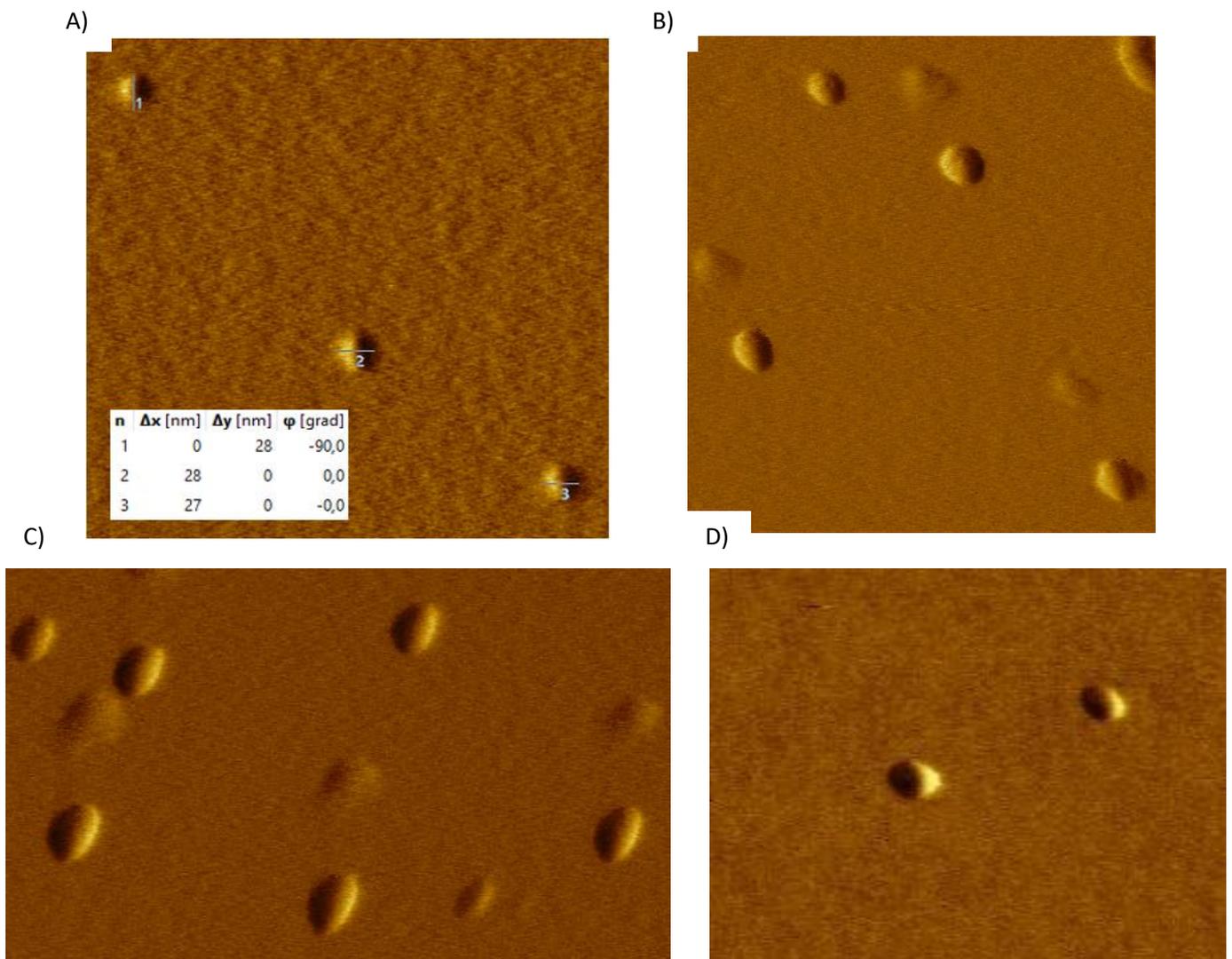


**Figura 27. Cromatografía de exclusión molecular para la muestra después de la columna aniónica.** A) SDS-PAGE al 12.5 % de las fracciones recolectadas durante la purificación. B) Análisis por DLS de la fracción 3 obtenida por SEC.

## 6.7 Caracterización estructural de las VLPs

### 6.7.1 Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)

La caracterización estructural de las nanopartículas formadas a partir de la proteína de cápside de BMV expresada en un sistema heterólogo de *E. coli*, se realizó mediante microscopia de fuerza atómica. Las imágenes obtenidas muestran la presencia de estructuras cuasi-esféricas con un diámetro de  $28 \pm 2$  nm, valor correspondiente al obtenido por DLS, 30 nm. Además de la forma esférica de los ensambles de CP, también se observa monodispersidad en estas estructuras encontradas.



**Figura 28.** Imágenes obtenidas por microscopia de fuerza atómica para las nanopartículas a partir de CP del BMV(A-D). En la primera imagen se marcan las distancias obtenidas para 3 VLPS

## 6.7.2 Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM)

Además de la visualización estructura de las partículas por AFM, también se analizaron mediante microscopía de transmisión electrónica. En las imágenes obtenidas se observaron estructuras más esféricas y con diámetros entre 26-28 nm, similares a los diámetros obtenidos por AFM que, de igual manera, se observa una población monodispersa. Con las imágenes obtenidas por ambas microscopias, AFM y TEM, se puede confirmar que, mediante la expresión de la CP en *E. coli*, se pueden obtener VLPs de BMV con diámetros similares a los obtenidos en viriones o VLPs de BMV producidos por plantas infectadas.

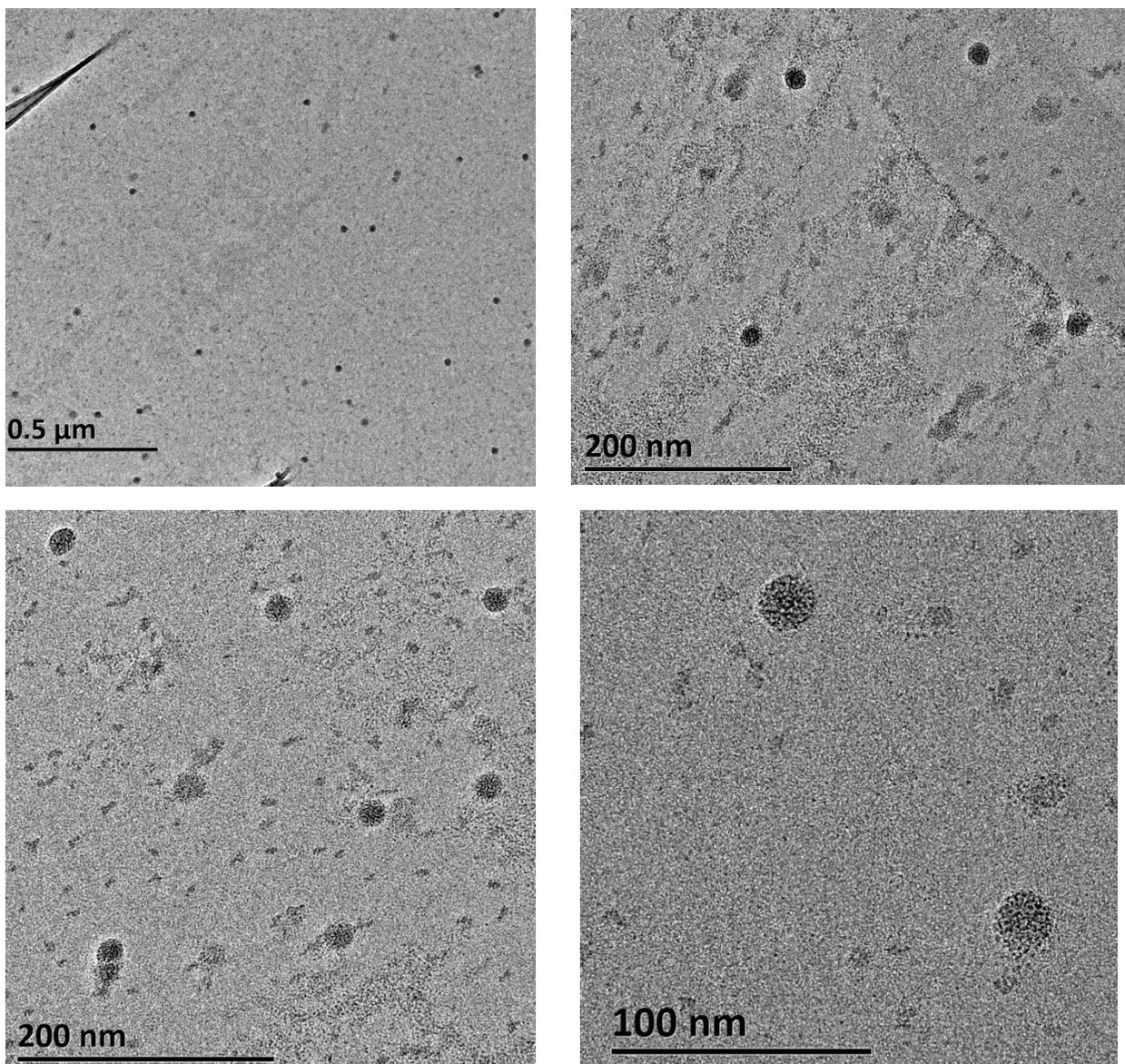


Figura 29. Imágenes obtenidas por Microscopía de transmisión electrónica para las nanopartículas a partir de CP del BMV

## **6.8 Condiciones de desensamble**

Después de caracterizar la estructura particular de las VLPs de BMV, se estudiaron condiciones de desensamble para obtener las unidades formadoras de cápside, CP. Para este ensayo, primero se analizó el efecto del pH sobre la estructura de la cápside, debido a que se ha reportado que el proceso de ensamble y desensamble, principalmente está regulado por los cambios de pH ácido a básico y, de acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de estabilidad, se estableció como fuerza iónica, una concentración de NaCl 1 M, ya que a esta concentración en pH 8, se encontraron alteraciones en el diámetro hidrodinámico de los ensambles de BMV. Además del efecto del pH, también se evaluó el efecto de la adición de agentes caotrópicos, como urea y guanidina, al amortiguador en pH 8. Para todos los casos, se trataron muestras con una concentración de proteína alrededor de 0.3-0.4 mg/mL y los cambios en el tamaño del diámetro hidrodinámico de los ensambles fueron evaluados mediante DLS.

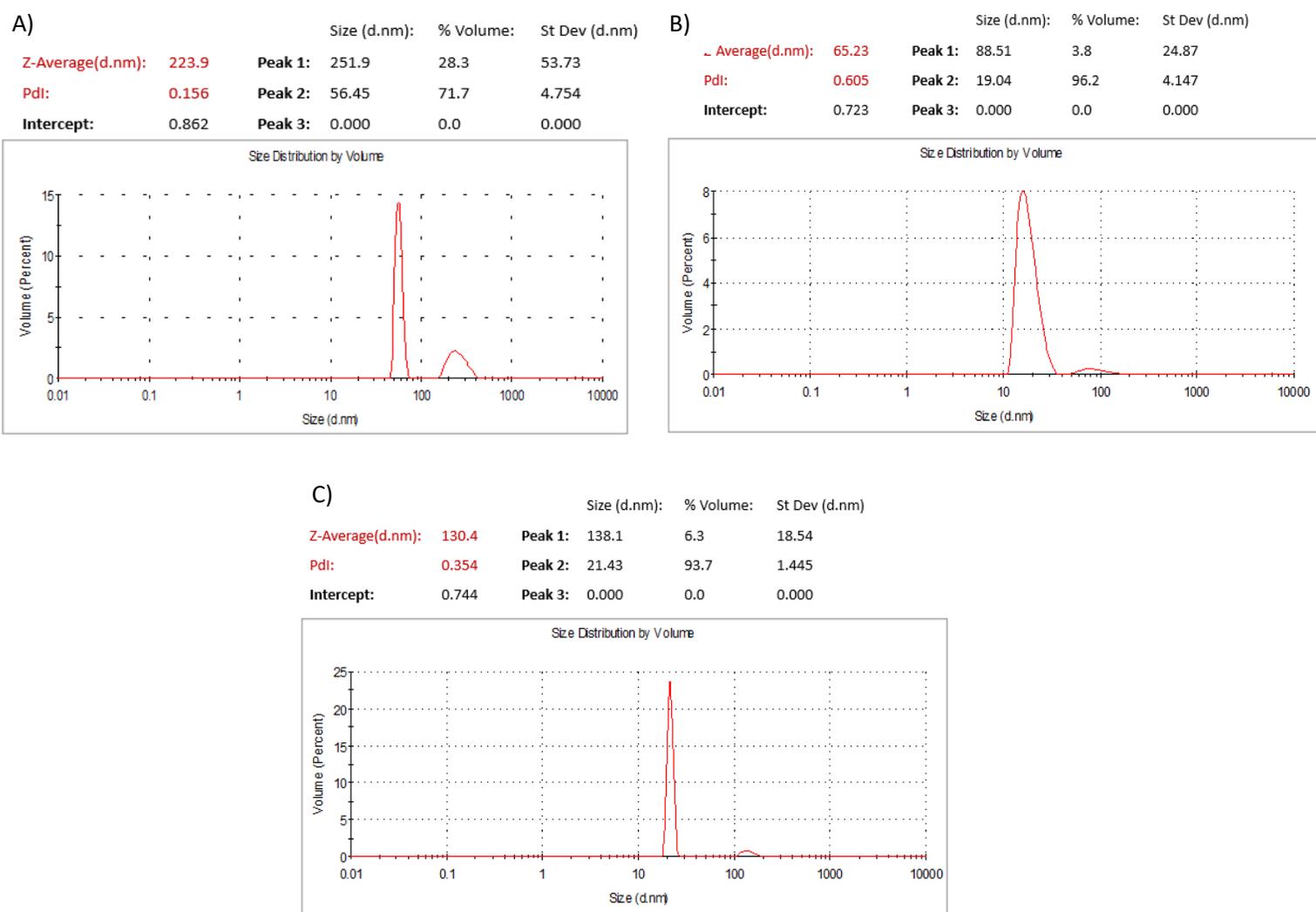
### **6.8.1 Efecto del pH**

Después de los análisis de estabilidad de las VLPs, en los cuales se observó que a pH 8.4, se encuentran dos poblaciones con tamaños de diámetro alrededor de 40 y 180 nm, se decidió evaluar el mismo amortiguador con EDTA (Tris-HCl 20 mM pH 8.4, NaCl 1 M, DTT 1 mM, EDTA 10 mM) en diálisis durante 24 h. Los resultados muestran la presencia de dos poblaciones, con diámetros de aproximadamente 56 y 252 nm (Figura 30A), valores ligeramente más grandes con respecto a la muestra tratada en diálisis durante 12 h. Por lo que se consideró que el amortiguador de Tris-HCl, NaCl, EDTA, independiente del tiempo, genera solo estructuras con tamaños más grandes.

Posteriormente se evaluó el amortiguador formado por PBS, NaCl 1 M, DTT 1 mM, L-arginina 0.2 M, EDTA 10 mM a pH 7.4, esperando que la L-arginina evite la agregación de las VLPs y el amortiguador de PBS mejore la separación de las

subunidades que interaccionan con los ácidos nucleicos. Las muestras se dejaron dializando ON y al analizarlas por DLS, se obtuvieron dos poblaciones con diámetros de 19 y 88 nm (Figura 30B), diámetros más pequeños en comparación con los obtenidos con el amortiguador de Tris-HCl a pH 8.

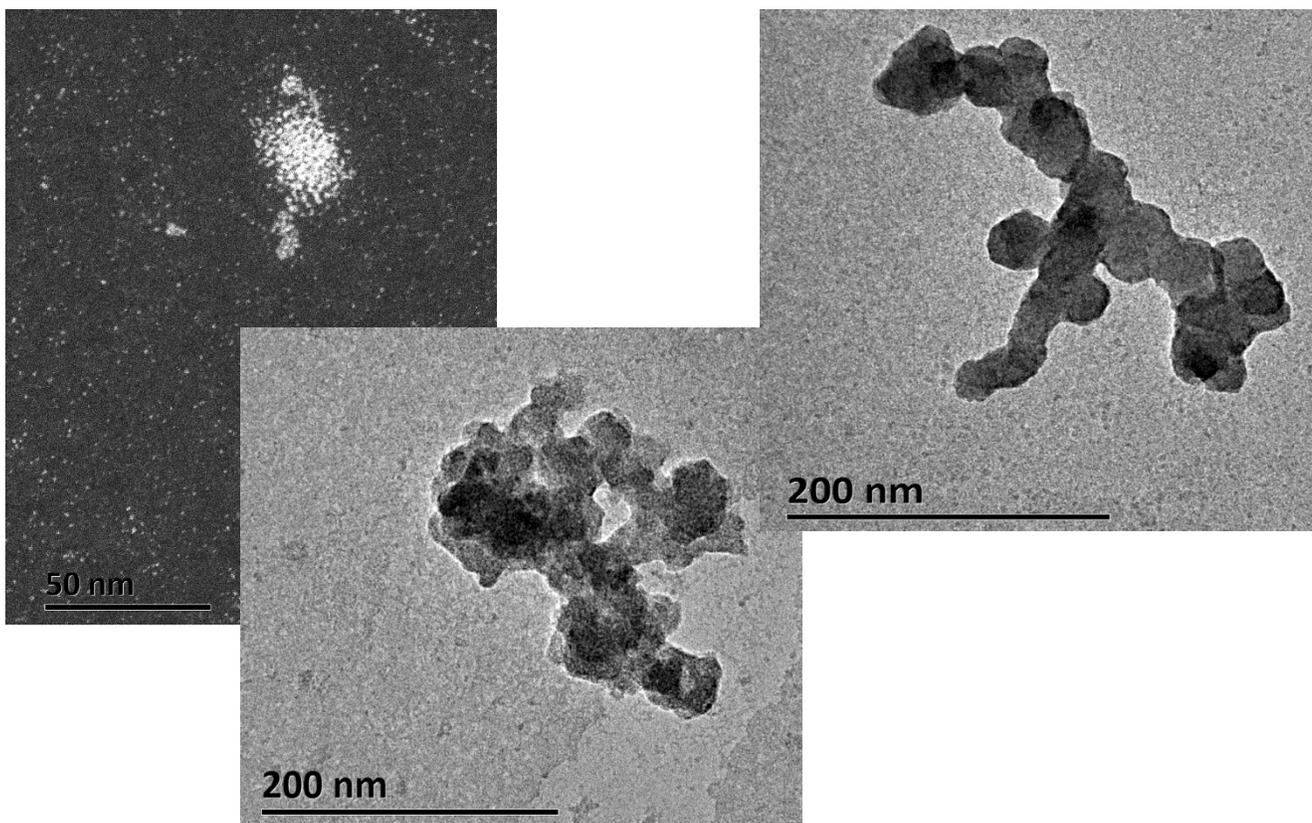
Finalmente, se evaluó el amortiguador de desensamble con la adición de CaCl<sub>2</sub> (Tris-HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.5 M, DTT 1 mM, EDTA 10 mM, pH 8). Las muestras, al igual que los casos anteriores se dejaron dializando contra este amortiguador durante 16 h y al término del tiempo, en las muestras analizadas, se observaron mayoritariamente dos poblaciones con diámetros 21 y 138 nm (Figura 30C).



**Figura 30. Análisis de DLS para las condiciones de desensamble a diferentes amortiguadores.** A) Tris-HCl 20 mM pH 8.4, NaCl 1 M, DTT 1 mM, EDTA 10 mM. B) PBS, NaCl 1 M, DTT 1 mM, L-arginina 0.2 M, EDTA 10 mM a pH 7.4. C) Tris-HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.5 M, DTT 1 mM, EDTA 10 mM a pH 8.

Las poblaciones resultantes con diámetros alrededor de 19 y 21 nm, correspondientes a los amortiguadores de PBS y Tris-CaCl<sub>2</sub>, probablemente podría corresponder a estructuras icosaédricas en un arreglo T=1, como se observó en un trabajo realizó por Lucas y colaboradores en el 2001, donde observaron que las cápsides del BMV que fueron tratadas con altas concentraciones de CaCl<sub>2</sub> a alta fuerza iónica, experimentaron una condensación de la estructura de T=3 a T=1 por desprendimiento de los capsómeros hexaméricos, estas cápsides T=1 presentaron un diámetro de alrededor de 17-18 nm. Tamaños similares a los obtenidos en este trabajo (19 y 21 nm).

En cuanto a las poblaciones con diámetros hidrodinámicos aproximadamente de 250 nm y otros tamaños más grandes, obtenidos principalmente mediante diálisis contra el amortiguador de Tris-NaCl (Tris-HCl 20 mM pH 8.4, NaCl 1M, DTT 1 mM, EDTA 10 mM), fueron observadas mediante TEM, encontrado grandes poblaciones de agregados, probablemente de varias cápsides acumuladas formando especies con diámetros mayores a 250 y 300 nm (Figura 31).

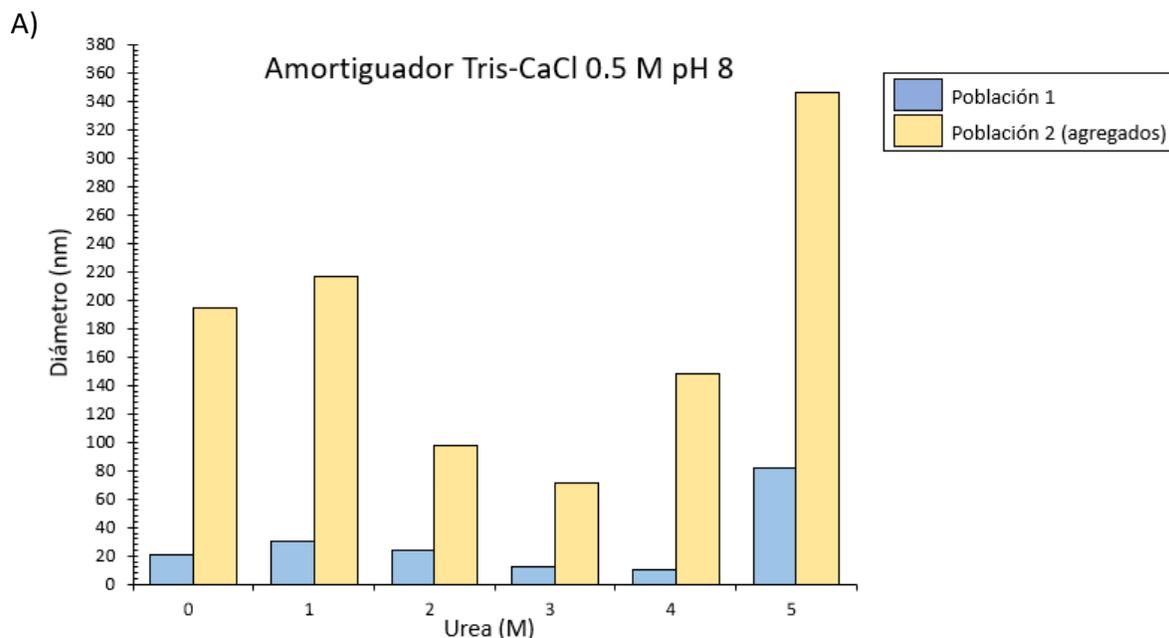


**Figura 31.** Imágenes de TEM para muestra de desensamble en amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 8.4, NaCl 1M, DTT 1 mM, EDTA 10 mM.

## 6.8.2 Efecto de agentes caotrópicos

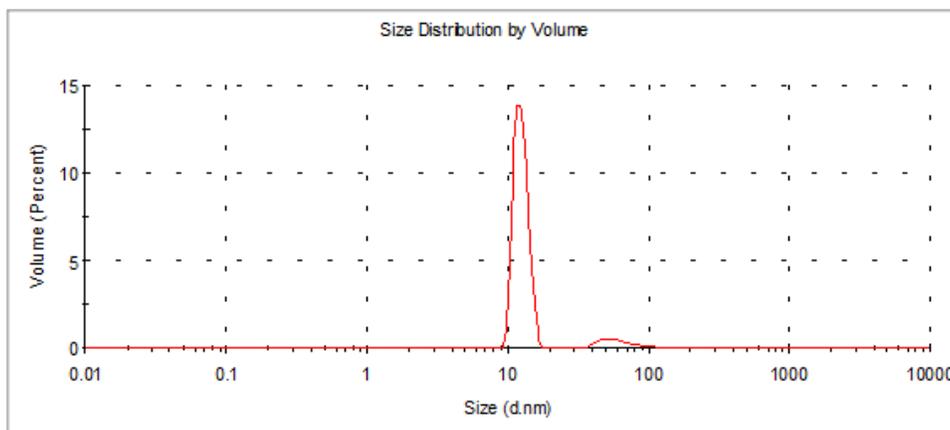
Debido a que, en los diferentes amortiguadores a pH básicos analizados en la sección anterior, no se logró obtener poblaciones con diámetros más pequeños, que corresponderían a subunidades, dímeros o estructuras intermedias como hexámeros o pentámeros. Se estudió el efecto de la adición de agentes caotrópicos (urea y guanidina) a la muestra en amortiguador Tris-HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.5 M, DTT 1 mM, EDTA 10 mM, a pH 8, ya que en ese amortiguador se observó mayor cambio en el diámetro hidrodinámico de las VLPs. Se esperaba que la adición de CaCl<sub>2</sub> mejoraría la separación de los ácidos nucleicos de las subunidades de CP.

Primero se analizó el efecto de la urea, para ello se evaluaron concentraciones de 1, 2, 3, 4 y 5 M (Figura 32A). Se obtuvieron principalmente dos poblaciones para todas las concentraciones de urea. A partir de 2 M, el tamaño del diámetro de las VLPs comenzó a disminuir, encontrando que, en concentraciones entre 3 y 4 M de urea, se alcanzaban poblaciones con diámetros alrededor de 10-15 nm, mayoritariamente de 12 nm para la población con tamaño menor. Mientras que, la otra población presentaba diámetros de 63 nm para 3 M (Figura 32B) y 148 nm para 4 M. En cuanto a la muestra tratada con 5 M de urea, causó en las dos poblaciones un aumento considerable en el diámetro de las partículas, con valores de aproximadamente 81 y 346 nm.



B)

	Size (d.nm):	% Volume:	St Dev (d.nm)
<b>Z-Average(d.nm):</b> 71.91	<b>Peak 1:</b> 63.57	7.4	25.54
<b>Pdl:</b> 0.598	<b>Peak 2:</b> 12.47	92.6	1.437
<b>Intercept:</b> 0.764	<b>Peak 3:</b> 0.000	0.0	0.000

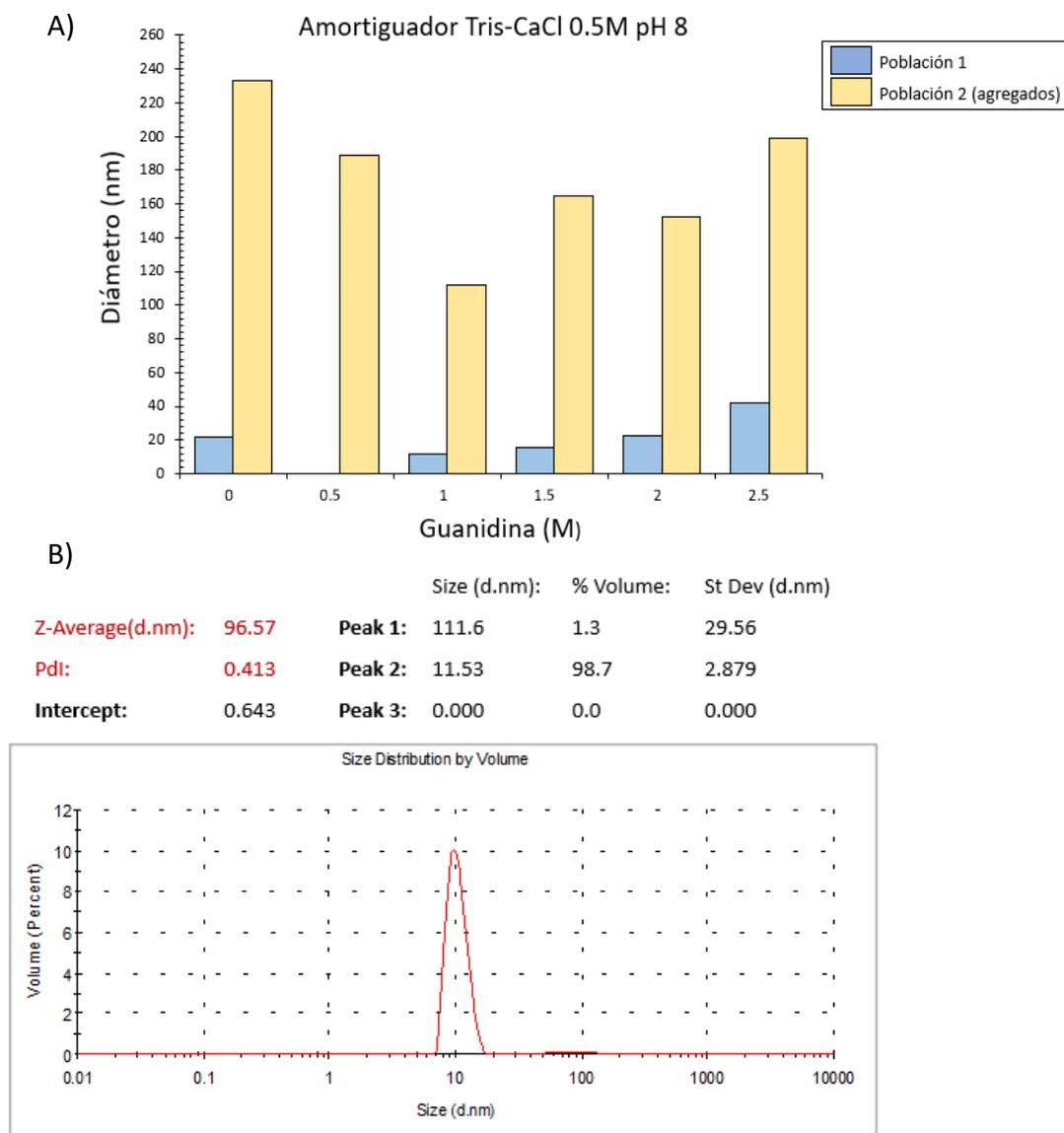


**Figura 32.** Efecto de urea en el tamaño de las VLPs. A) Diámetros resultantes de la adición de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 M de urea. B) Resultados del DLS para la muestra tratada con 3 M de urea.

Además de la adición de urea, se evaluó el efecto de la concentración de guanidinio en el diámetro hidrodinámico de las VLPs. Para ello se probaron concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 M de cloruro de guanidinio (Figura 33A). A partir de 0.5 M de guanidinio, los diámetros comenzaron a modificarse, y se encontró una sola población con tamaños mayores a 150 nm. Mientras que, para concentraciones de 1.0 y 1.5 se observaron dos poblaciones, una con tamaño entre 11 y 15 nm (Figura 33B), similares a los observados con el tratamiento con urea. Sin embargo, para el caso de guanidinio, los resultados obtenidos entre experimentos no eran tan variables como en el caso de la urea. Además, con 1.0 y 1.5 M de guanidinio, también se observó un aumento en el tamaño de los agregados, los cuales presentaban valores entre 100 y 160 nm. En el caso de las concentraciones de 2 y 2.5, el diámetro tendió a aumentar, encontrando mayoritariamente agregados de VLPs, con valores mayores a 150 nm.

La población con un tamaño de diámetro alrededor de 11 nm, resultado del tratamiento con 1.0 M de guanidina, podría sugerir la presencia de oligómeros más

simples o intermediarios de ensamble, ya que se ha registrado que el tamaño de los dímeros de CP del BMV es de aproximadamente 7.22 nm (Chen et al., 2008) y 6.4 nm (Strugała et al., 2021).



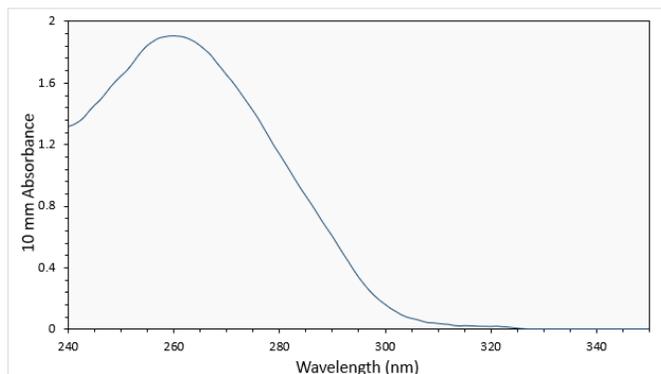
**Figura 33.** Efecto de guanidina en el tamaño de las VLPs. A) Diámetros resultantes de la adición de 0.5, 1, 1.5, 2 y 2.5 M de urea. B) Resultados del DLS para la muestra tratada con 1 M de guanidina.

Al obtener la población con el menor valor del diámetro (11 nm) de las VLPs con el tratamiento de 1 M de guanidina en amortiguador de Tris-HCl 50 mM, DTT 1 mM, EDTA 10 mM a pH 8 en presencia de CaCl<sub>2</sub> 0.5 M, se evaluó el efecto que

podría presentar en los ácidos nucleicos encapsulados. Para ello, se evaluó mediante NanoDrop con el coeficiente de extinción molar  $16.64 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y el peso molecular de CP, 20.3 kDa, la relación A260/A280 de la muestra concentrada antes del cambio de amortiguador de ensamble al de desensamble con  $\text{CaCl}_2$  (Figura 34A). En esta figura se observa que la relación A260/A280 es de 1.68, representando la importante presencia de material genético. Después del cambio de amortiguador, la adición de 1 M de guanidina y una diálisis de 4 h en amortiguador Tris-HCl 50 mM,  $\text{CaCl}_2$  0.5 M, DTT 1 mM, EDTA 10 mM a pH 8, se volvió a evaluar la relación A260/A280, dando como resultado 1.10 (Figura 34B), un valor menor al obtenido inicialmente. Estos resultados sugieren que, posiblemente el tratamiento con  $\text{CaCl}_2$  permite la disminución de los ácidos nucleicos contaminantes.

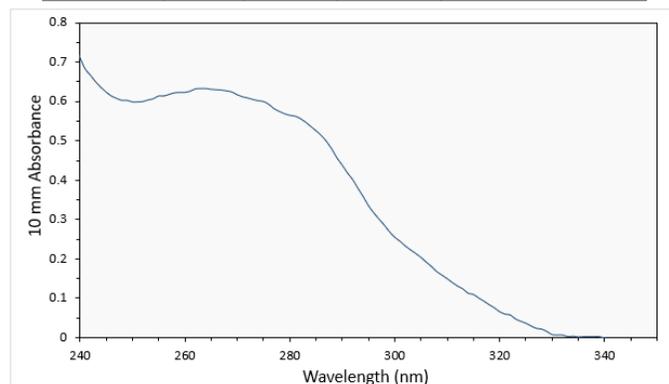
A)

Protein Conc.	Unit	A280	260/280	Sample Type
1.088	mg/ml	0.965	1.68	(E & MW) 16.64 & 20.3



B)

Protein Conc.	Unit	A280	260/280	Sample Type
0.689	mg/ml	0.565	1.10	(E & MW) 16.64 & 20.3



**Figura 123.** Evaluación de la relación A260/A280 en las VLPs de BMV A) antes y B) después del tratamiento con  $\text{CaCl}_2$  0.5 M y guanidina 1M.

## 7 CONCLUSIONES

La expresión heteróloga de la proteína de cápside del virus del mosaico del bromo se logró en dos cepas de *E. coli*, BL21(DE3) y BL21(DE3)pGro7. En la primera cepa, BL21(DE3), se obtuvo la expresión de CP con las siguientes condiciones de inducción: 0.6 mM de IPTG durante 16 h a 25 °C y 180 rpm; con esta cepa se logró escalar la expresión hasta 100 mL. En cuanto a la cepa BL21(DE3)pGro7, las condiciones de sobreexpresión de CP se alcanzaron con 0.6 mM de IPTG como inductor, por 16 h a 37°C y 220 rpm; estas condiciones de inducción son escalables hasta volúmenes de 500 mL. Además, la sobreexpresión de CP en la cepa BL21(DE3)pGro7 es mayor en comparación con la expresión obtenida con la cepa BL21(DE3).

La CP obtenida en la cepa de *E. coli* BL21(DE3)pGro7 se encontró plegada en la fracción soluble después de la lisis celular con el siguiente amortiguador: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, Tritón X100 0.2 %, DTT 1 mM, pH 7.5

El protocolo de purificación para CP producida en *E. coli* BL21pGro7, requirió la separación de CP del complejo de chaperonas GroEL-GroES con 5 mM de ATP-Mg<sup>2+</sup> en amortiguador Tris-HCl 20mM pH 8, y posteriormente la purificación por una columna aniónica SOURCE 15Q 4.6/100 PE. Finalmente, se utiliza la cromatografía de exclusión molecular con la columna Superdex 200 16/600 en amortiguador de ensamble (AcONa 53 mM, AcOH 47 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 100 mM, DTT 1 mM, pH 4.8) para obtener nanopartículas de BMV.

La proteína de cápside se obtuvo pura y ensamblada con un diámetro hidrodinámico alrededor de 30 nm en una población monodispersa caracterizada por DLS, AFM y TEM, para ambas microscopias se observaron diámetros entre 27-29 nm.

Se encontró alta estabilidad en los ensambles de BMV frente a cambios de pH (4.8, 5.6, 6.4, 7.5 y 8.4), fuerza iónica (0.1, 0.5, y 1.0 M NaCl) con presencia y ausencia de iones Mg<sup>+2</sup> (10 mM de MgCl<sub>2</sub> y 10 mM EDTA). La alta estabilidad puede

ser proporcionada por la interacción existente entre los ácidos nucleicos de *E. coli* y la proteína de cápside, lo que le podría proporcionar características similares a los viriones de BMV.

La adición de benzonasa a la muestra obtenida después de la lisis celular, favorece la purificación de CP, ya que enriquece la presencia de la proteína de cápside en las primeras fracciones obtenidas por la columna aniónica y SEC.

Es posible que el ensamble de CP se lleve a cabo durante la lisis celular o de manera *in vivo* en *E. coli*, ya que durante su purificación se encontró que no requiere de pH ácido (4.8) en el medio para inducir el ensamble. Estas nanopartículas pueden ser purificadas por SEC desde las fracciones obtenidas en la columna aniónica. Sin embargo, el paso previo de diálisis contra amortiguador de ensamble a pH 4.8, evita la formación de agregados en las nanopartículas y por lo tanto enriquece las fracciones obtenidas por SEC, además de que limpia la muestra al precipitar muchas proteínas contaminantes.

El desensamble de las VLPs de BMV se ve favorecido por un cambio de amortiguador a pH 8 en presencia de  $\text{CaCl}_2$  y la adición de guanidinio a una concentración final de 1 M. Proporcionando estructuras con un diámetro hidrodinámico de 11.5 nm y otros agregados de 111 nm. Además, este tratamiento permitió la disminución del valor de la relación A260/A280, inicialmente con 1.68 a 1.10.

## 8 PERSPECTIVAS

- Con el objetivo de mejorar el desensamble y la obtención de subunidades CP, sería importante evaluar la función de factores como concentración de proteína, tiempos en los tratamientos con agentes químicos como urea, guanidinio, CaCl<sub>2</sub>; cambios en los componentes de los amortiguadores para evitar la agregación de proteína y métodos adicionales como ultracentrifugación.
- Estandarizar las condiciones de ensamble y desensamble, ya que se puede hacer uso de dicha característica y su alta estabilidad de las cápsides de BMV para el encapsulamiento de diversas moléculas.
- Estudiar la sobreexpresión de la proteína de cápside con la adición de un His-Tag en el N-terminal, con las cepas de *E.coli* BL21(DE3) y BL21(DE3)pGro7, en la cuales se observó expresión de CP. Esto para evitar la unión y encapsulación de material genético huésped y mejorar la eficiencia en el protocolo de purificación, quizás en condiciones fuertemente desnaturizantes.

## REFERENCIAS

- Ahlquist, P. (1992). *Bromovirus RNA replication and transcription*. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2(1), 71–76. doi:10.1016/s0959-437x(05)80325-9
- Ahlquist, P., French, R., Buiarski, J. J. (1987) *Molecular Studies of Brome Mosaic Virus Using Infectious Transcripts from Cloned CDNA*. *Advances in Virus Research*, 32, 215-242. doi:10.1016/s0065-3527(08)60478-9
- Alemzadeha, E., Dehshahrib, A., Izadpanaha, K., Ahmadi F. (2018). *Plant virus nanoparticles: Novel and robust nanocarriers for drug delivery and imaging*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 167, 20–27. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.03.026
- Barwal, I., Kumar, R., Kateriya, S., Dinda, A. K., & Yadav, S. C. (2016). *Targeted delivery system for cancer cells consist of multiple ligands conjugated genetically modified CCMV capsid on doxorubicin GNPs complex*. *Scientific Reports*, 6(1). doi:10.1038/srep37096
- Bar-Zeev, M., Livney, Y. D., Assaraf, Y. G. (2017). *Targeted nanomedicine for cancer therapeutics: Towards precision medicine overcoming drug resistance*. *Drug Resistance Updates*, 31, 15-30. doi:10.1016/j.drug.2017.05.002
- Beren, C., Cui, Y., Chakravarty, A., Yang, X., et al. (2020). *Genome organization and interaction with capsid protein in a multipartite RNA virus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(20):10673-10680. doi:10.1073/pnas.1915078117
- Berthet-Colominas, C., Cuillel, M., J Koch, M. H., & Jacrot, B. (1987). *European Biophysics Journal Kinetic study of the self-assembly of brome mosaic virus capsid*. In *Eur Biophys J* (Vol. 15).
- Bockstahler, L. E., & Kaesberg, P. (1962). *The Molecular Weight and Other Biophysical Properties of Bromegrass Mosaic Virus*. *Biophysical Journal*, 2(1), 1–9. doi:10.1016/s0006-3495(62)86836-2
- Brumfield, S., Willits, D., Tang, L., Johnson, J. E., et al. (2004). *Heterologous expression of the modified coat protein of Cowpea chlorotic mottle bromovirus results in the assembly of protein cages with altered architectures and function*. *Journal of General Virology*, 85 (4), 1049–1053. doi: 10.1099/vir.0.19688-0
- Chaudhary, A., & Yadav, R. D. (2019). *A review on virus protein self-assembly*. *Journal of Nanoparticle Research*, 21(11). doi:10.1007/s11051-019-4669-0
- Chen, C., Daniel, M-C., Quinkert, Z. T., Stein, M.B, et al. (2006) *Nanoparticle-Templated Assembly of Viral Protein Cages*. *Nano Letters*, 6(4), 611-615. doi: 10.1021/nl0600878
- Chen, C., Kao, C. C., & Dragnea, B. (2008). *Self-assembly of brome mosaic virus capsids: Insights from shorter time-scale experiments*. *Journal of Physical Chemistry A*, 112(39), 9405–9412. doi:10.1021/jp802498z

- Daegelen, P., Studier, F. W., Lenski, R. E., Cure, S., & Kim, J. F. (2009). *Tracing Ancestors and Relatives of Escherichia coli B, and the Derivation of B Strains REL606 and BL21(DE3)*. *Journal of Molecular Biology*, 394(4), 634–643. doi:10.1016/j.jmb.2009.09.022
- Dai, S., Wang, H., Deng, F. (2018). Advances and challenges in enveloped virus-like particle (VLP)-based vaccines. *Journal of Immunological Sciences*.2(2). doi:10.29245/2578-3009/2018/2.1118
- Dedeo, M.T., Finley, D.T., Francis, M.W. (2011). *Viral Capsids as Self-Assembling Templates for New Materials*. *Prog. Mol. Biol.* 103, 353–392. doi:10.1016/B978-0-12-415906-8.00002-9
- Deuerling, E., & Bukau, B. (2004). Chaperone-assisted folding of newly synthesized proteins in the cytosol. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 39(5–6), 261–277. doi:10.1080/10409230490892496
- Díaz-Valle, A., García-Salcedo, Y. M., Chávez-Calvillo, G., Silva-Rosales, L., & Carrillo-Tripp, M. (2015). *Highly efficient strategy for the heterologous expression and purification of soluble Cowpea chlorotic mottle virus capsid protein and in vitro pH-dependent assembly of virus-like particles*. *Journal of Virological Methods*, 225, 23–29. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.08.023
- Dixit, S., Goicochea, N. L., Daniel, M.-C., Murali, A. et al, (2006). *Quantum Dot Encapsulation in Viral Capsids*. *Nano Letters*, 6(9), 1993-1999. doi: 10.1021/nl061165u
- Dragnea, B., Chen, C., Kwak, E-S., Stein, B., Kao, C.C. (2003) *Gold Nanoparticles as Spectroscopic Enhancers for in Vitro Studies on Single Viruses*. *J. AM. CHEM. SOC.* 125, 6374-6375. doi:10.1021/ja0343609
- Dubendorf, J. W., & Studier, F. W. (1991). *Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor*. *Journal of Molecular Biology*, 219(1), 45–59. doi:10.1016/0022-2836(91)90856-2
- Fuenmayor, J., Gòdia, F., Cervera, L. (2017). Production of virus-like particles for vaccines. *New Biotechnol.*;39:174–80. doi:10.1016/j.nbt.2017.07.010
- Gleiter, S., Lillie, H. (2001). *Coupling of antibodies via protein Z on modified polyoma virus-like particles*. *Protein Science*. 10(2), 434–444. doi:10.1110/ps.31101
- Grodberg, J., & Dunn, J. J. (1988). *ompT encodes the Escherichia coli outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification*. *J. Bacteriol.* 170, 1245–1253.
- Gruber, R., & Horovitz, A. (2016). *Allosteric Mechanisms in Chaperonin Machines*. *Chemical Reviews*, 116(11), 6588–6606. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00556

- Gupta, S., Chatni, M.R., Rao, A.L.N., Vullev, V.I., et al. (2013) *Virus-mimicking nano-constructs as a contrast agent for near infrared photoacoustic imaging*. *Nanoscale*,5(5), 1772-1776. doi:10.1039/c3nr34124k
- He, G., Zhang, Z., Sathanantham, P., Diaz, A., & Wang, X. (2020). *Brome Mosaic Virus (Bromoviridae)*. Reference Module in Life Sciences, June 2019, 1–8. doi:10.1016/b978-0-12-809633-8.21294-6
- Hema, M., Vishnu Vardhan, G. P., Savithri, H. S., & Murthy, M. R. N. (2019). *Emerging Trends in the Development of Plant Virus-Based Nanoparticles and Their Biomedical Applications*. In *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*. Elsevier Inc. doi:10.1016/b978-0-12-816328-3.00006-4
- Huang, X., Bronstein, L. M., Retrum, J., Dufort, C., et al. (2007). *Self-Assembled Virus-like Particles with Magnetic Cores*. *Nano Letters*, 7(8), 2407–2416. doi:10.1021/nl071083l
- Huang, X., Stein, B.D., Cheng, H., Malyutin, A., et al. (2011). *Magnetic virus-like nanoparticles in N. benthamiana plants: a new paradigm for environmental and agronomic biotechnological research*. *ACS Nano* 5(5), 4037–4045. doi:10.1021/nn200629g
- Jung,B., Rao, A.L.N., Anvari, B. (2011). *Optical Nano-Constructs Composed of Genome-Depleted Brome Mosaic Virus Doped with a Near Infrared Chromophore for Potential Biomedical Applications*. *ACS Nano*, 5(2), 1243–1252. doi: 10.1021/nn1028696
- Kao, C. C., Ni, P., Hema, M., Huang, X., & Dragnea, B. (2011). *The coat protein leads the way: an update on basic and applied studies with the Brome mosaic virus coat protein*. *Molecular Plant Pathology*, 12(4), 403–412. doi:10.1111/j.1364-3703.2010.00678.x
- Keles, E., Song, Y., Du, D., Dong, W. J., Lin, Y. (2016). *Recent progress in nanomaterials for gene delivery applications*. *Biomater. Sci.* 9. doi:10.1039/C6BM00441E
- Kunjachan, S., Ehling, J., Storm, G., Kiessling, F., Lammers, T. (2015). *Noninvasive Imaging of Nanomedicines and Nanotheranostics: Principles, Progress, and Prospects*. *Chemical Reviews*, 115 (19) 10907-10937. doi:10.1021/cr500314d
- Lavelle, L., Michel, J. P., & Gingery, M. (2007). *The disassembly, reassembly and stability of CCMV protein capsids*. *Journal of Virological Methods*, 146(1–2), 311–316. doi:10.1016/j.jviromet.2007.07.020
- Lucas, R. W., Kuznetsov, Y. G., Larson, S. B., & McPherson, A. (2001). *Crystallization of Brome Mosaic Virus and T = 1 Brome Mosaic Virus Particles Following a Structural Transition*. *Virology*, 286(2), 290–303. doi:10.1006/viro.2000.0897
- Lucas, R. W., Larson, S. B., & McPherson, A. (2002). *The crystallographic structure of brome mosaic virus*. *Journal of Molecular Biology*, 317(1), 95–108. doi:10.1006/jmbi.2001.5389
- MaHam, A., Tang, Z., Wu, H., Wang, J., Lin, Y. (2009). *Protein-Based Nanomedicine Platforms for Drug Delivery*. 5(15), 1706–1721. doi:10.1002/sml.200801602
- Marchenkov, V., Gorokhovatsky, A., Marchenko, N., Ivashina, T., & Semisotnov, G. (2020).

*Back to GroEL-assisted protein folding: GroES binding-induced displacement of denatured proteins from GroEL to bulk solution.* Biomolecules, 10(1). doi:10.3390/BIOM10010162

Mateu, M. G. (2013). *Assembly, stability and dynamics of virus capsids.* In Archives of Biochemistry and Biophysics (Vol. 531, Issues 1–2, pp. 65–79). Academic Press Inc. doi:10.1016/j.abb.2012.10.015

Nasrollahzadeh, M., Sajadi M. S., Sajjadi M., Issaabadi Z. (2019). *An Introduction to Nanotechnology.* 28,1–27. doi:10.1016/B978-0-12-813586-0.00001-8

Nikalje, A. P. (2015). *Nanotechnology and its Applications in Medicine.* 5, 81–89. doi:10.4172/2161-0444.1000247

Núñez, A., Fournier, P. G. J., Arellano, D. L., Rodriguez, A. G., et al. (2020). *Brome mosaic virus-like particles as siRNA nanocarriers for biomedical purposes.* Beilstein Journal of Nanotechnology, 11(1), 372-382. doi:10.3762/bjnano.11.28

Ochoa, W. F., Chatterji, A., Lin, T., & Johnson, J. E. (2006). *Generation and Structural Analysis of Reactive Empty Particles Derived from an Icosahedral Virus.* Chemistry and Biology, 13(7), 771–778. doi: 10.1016/j.chembiol.2006.05.014

Pan, Y., Jia, T., Zhang, Y., Zhang, K., et al. (2012). *MS2 VLP-based delivery of microRNA-146a inhibits autoantibody production in lupus-prone mice.* Int J Nanomedicine. 7, 5957–5967. doi: 10.2147/IJN.S37990

Perlmutter, J. D., & Hagan, M. F. (2015). *Mechanisms of Virus Assembly.* Annual Review of Physical Chemistry, 66(1), 217–239. doi:10.1146/annurev-physchem-040214-121637

Pfeiffer, P., Herzog, M., & Hirth, L. (1976). *Stabilization of Brome Mosaic Virus.* 276(943).

Pfeiffer, P., & Hirth, L. (1974). *Aggregation states of Brome mosaic virus protein.* Virology, 61(1), 160–167. doi:10.1016/0042-6822(74)90251-7

Phelps, J.P., Dao, P., Jin, H. Rasochova, L. (2007). *Expression and self-assembly of cowpea chlorotic mottle virus-like particles in Pseudomonas fluorescens.* Journal of Biotechnology, 128(2), 290-296. doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.10.005

Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. G., Chen, G., Deber, C. M. (2009). *Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(6), 1760–1765. doi:10.1073/pnas.0813167106

Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). *Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges.* Frontiers in Microbiology, 5(APR), 1–17. doi:10.3389/fmicb.2014.00172

Saxena, S. K., Nyodu, R., Kumar, S., Maurya, V. K. (2020). *Current Advances in Nanotechnology and Medicine.* NanoBioMedicine. 3-17. doi:10.1007/978-981-32-9898-9

Schneider, C. (2000). *Chaperonin Protocols.* In Chaperonin Protocols. 140, pp. 29-51 doi:10.1385/1592590616

- Sessa, G., Weissmann, G. (1968) *Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes*. J. Lipid Res. 9, 310–318
- Shlomai, A., Lubelsky Y., Har-Noy O., Shaul Y. (2009). *The “Trojan horse” model-delivery of anti-HBV small interfering RNAs by a recombinant HBV vector*. Biochemical and Biophysical Research Communications 390(3), 619–623. doi:10.1016/j.bbrc.2009.10.016
- Simonazzi, A. (2018). *Nanotechnology applications in drug controlled release*. 81–116. doi:10.1016/B978-0-12-813689-8.00003-3
- Speir, J.A., Munshi, S., Wang, G.J., Baker, T.S., Johnson, J.E., (1995). *Structures of the Native and Swollen Forms of Cowpea Chlorotic Mottle Virus Determined by X- Ray Crystallography and Cryoelectron Microscopy*. Structure 3, 63–78
- Steele J., Peyret H., Saunders K., Castells-Graells R., Marsian J., et al. (2017). *Synthetic plant virology for nanobiotechnology and nanomedicine*. Nanomedicine and Nanobiotechnology. 9, 1-18. doi: 10.1002/wnan.1447
- Strugała, A., Jagielski, J., Kamel, K., Nowaczyk, G., et al. (2021). *Virus-Like Particles Produced Using the Brome Mosaic Virus Recombinant Capsid Protein Expressed in a Bacterial System*. International Journal of Molecular Sciences. 22(6), 1-15. doi: 10.3390/ijms22063098
- Strugała, A., Kręcis, M., Rybka, J. D., Urbanowicz, A., Szpotkowski, K., Bierwagen, P. et al. (2017). *Biophysical analysis of BMV virions purified using a novel method*. Journal of Chromatography B, 1068-1069, 157-163. doi:10.1016/j.jchromb.2017.10.022
- Studier, F. W., & Moffatt, B. A. (1986). *Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes*. J.Mol. Biol. 189, 113–130. doi: 10.1016/0022-2836(86)90385-2
- Sun, J., DuFort, C., Daniel, M. C., Murali, A., et al. (2007). *Core-controlled polymorphism in virus-like particles*. 104(4), 1354–1359. doi:10.1073/pnas.0610542104
- Szefler, B. (2018). *Nanotechnology, from quantum mechanical calculations up to drug delivery*. International Journal of Nanomedicine, 13, 6143-6176. doi:10.2147/IJN.S172907
- Tang, Y.C., Chang, H.C., Roeben, A., Wischnewski, D., et al. (2006). *Structural Features of the GroEL-GroES Nano-Cage Required for Rapid Folding of Encapsulated Protein*. Cell, 125(5), 903–914. doi:10.1016/j.cell.2006.04.027
- Van Kan-Davelaar, H. E., Van Hest, J. C. M., Cornelissen, J. J. L. M., & Koay, M. S. T. (2014). *Using viruses as nanomedicines*. British Journal of Pharmacology, 171(17), 4001–4009. doi:10.1111/bph.12662
- Vázquez-Duhalt R.(2020). *Viral Structures in Nanomedicine*. Technology, Science and Culture - A Global Vision. 2,1-13. doi:10.5772/intechopen.90099
- Venkataraman, S., Reddy, V. S., Khurana, S. M. P., (2020) *Biomedical Applications of Viral Nanoparticles in Vaccine Therapy*. NanoBioMedicine, 213-236. doi:10.1007/978-981-32-9898-9\_9

- Vicente, T., Roldão, A., Peixoto, C., Carrondo, M. J.T., Alves, P. M. (2011). *Large-scale production and purification of VLP-based vaccines*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107, S42-S48. doi:10.1016/j.jip.2011.05.004
- Wagner, V., Dullaart, A., Bock, A.-K., Zweck, A. (2006). *The emerging nanomedicine landscape*. *Nat Biotechnol* 24(10), 1211–1217. doi:10.1038/nbt1006-1211
- Wang, K., Zhu, X., Yu, E., Desai, P., et al. (2020). *Therapeutic Nanomaterials for Neurological Diseases and Cancer Therapy*. *Journal of Nanomaterials*, 2020, 1–18. doi:10.1155/2020/2047379
- Wen, A. M., Lee, K. L., Yildiz, I., Bruckman, M. A., et al. (2012). *Viral Nanoparticles for in vivo Tumor Imaging*. *Journal of Visualized Experiments*, 69, doi:10.3791/4352
- Wen, A. M., & Steinmetz, N. F. (2016). *Design of virus-based nanomaterials for medicine, biotechnology, and energy*. *Chemical Society Reviews*, 45(15), 4074–4126. doi:10.1039/C5CS00287G
- Wu, L. P., Wang, D., Li, Z. (2019). *Grand challenges in nanomedicine*. *Materials Science and Engineering: C*. 106 doi:10.1016/j.msec.2019.110302
- Wu, Y., Yang, H., Shin, H. (2013). *Viruses as self-assembled nanocontainers for encapsulation of functional cargoes*. *Korean J. Chem. Eng.*, 30(7), 1359-1367. doi:10.1007/s11814-013-0083-y
- Xu, Z., Horwich, A. & Sigler, P. *The crystal structure of the asymmetric GroEL–GroES-(ADP)<sub>7</sub> chaperonin complex*. *Nature*. 388, 741–750 (1997). doi:10.1038/41944
- Yildiz, I., Shukla, S., & Steinmetz, N. F. (2011). *Applications of viral nanoparticles in medicine*. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(6), 901–908. doi:10.1016/j.copbio.2011.04.020
- Yildiz, I., Tsvetkova, I., Wen, A. W., Shukla, S., et al. (2012). *Engineering of Brome mosaic virus for biomedical applications*. *RSC Advances*, 2, 3670–3677. doi:10.1039/c2ra01376b
- Zeltins, A. (2013). *Construction and Characterization of Virus-Like Particles: A Review*. *Mol Biotechnol* 53, 92–107. doi:10.1007/s12033-012-9598-4
- Zhang, C., Yan, L., Wang, X., Zhu, S., et al. (2020). *Progress, challenges, and future of nanomedicine*. *Nano Today*, 35, 101008–. doi:10.1016/j.nantod.2020.101008
- Zhang, G., Haradaa, A., Nishiyamaa, N., Jiangc D. L., Koyamad H., et al. (2003). *Polyion complex micelles entrapping cationic dendrimer porphyrin: effective photosensitizer for photodynamic therapy of cancer*. *Journal of Controlled Release*, 93(2), 141–150. doi:10.1016/j.jconrel.2003.05.002
- Zhang, Y., Dong, Y., Zhou, J., Li, X., Wang, F. (2018). *Application of Plant Viruses as a Biotemplate for Nanomaterial Fabrication*. *Molecules*, 23(9). doi:10.3390/molecules23092311
- Zhao, X., Fox, J. M., Olson, N. H., Baker, T. S., & Young, M. J. (1995). *In vitro assembly of cowpea chlorotic mottle virus from coat protein expressed in Escherichia coli and in*

*vitro-transcribed viral cDNA*. In *Virology*, 207, (2), pp. 486–494.  
doi:10.1006/viro.1995.1108