



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD DE PARTÍCULAS TIPO VIRUS ENSAMBLADAS
POR QUIMERAS DE LA PROTEÍNA VP2 DEL PARVOVIRUS B19

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Eduardo Javier Medina Iriarte

TUTOR PRINCIPAL

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

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

Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig
[Instituto de Química, UNAM](#)

Ciudad Universitaria, CD. MX. Octubre, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL**

(Graduación con trabajo escrito)

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado: **Estabilidad y reactividad de partículas tipo virus ensambladas por quimeras de la proteína vp2 del parvovirus b19**, que presenté para obtener el grado de -----Maestría----- es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

|En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

Eduardo Javier Medina Iriarte

No. De cuenta 304301322

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTA	Rodríguez Romero Adela
VOCAL	Ramírez Silva Leticia Haydeé
VOCAL	Arreguín Espinosa de los Monteros Roberto
VOCAL	Olguín Contreras Luis Fernando
SECRETARIA	Garza Ramos Martínez Georgina

ESTE TRABAJO CONTÓ CON RECURSOS DEL PROGRAMA DE APOYO A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN TECNOLÓGICA (PAPIIT) DE LA DIRECCIÓN GENERAL DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADÉMICO (DGAPA), UNAM, PROYECTOS IN205119 E IN210022.

DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE PROYECTO FUI BENEFICIADO CON UNA BECA OTORGADA POR EL CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES, CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS (CONAHCYT) PARA APOYO A ESTUDIOS DE MAESTRÍA.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme realizar mis estudios de Posgrado dentro del Programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías por el otorgamiento de la beca de excelencia para llevar a cabo la presente Tesis de Maestría.

A todo el profesorado del Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas con quien tuve la oportunidad de tomar clases, también agradezco a las personas que en aquel momento se encontraban desarrollando sus proyectos, ya que aprendí mucho de ellas.

Agradecimiento a la M. en C. Laura Álvarez-Añorve, Q. F. B. Eugenia Flores Robledo, Dra. Maribel Cayetano Cruz, M.C. Josefina Valadez García y Dra. Isabel Velázquez López, por todo el apoyo técnico brindado durante mi estancia en el Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas.

A mi tutor principal, el Dr. Ismael Bustos Jaimes, por recibirme en su grupo de trabajo, brindarme sus enseñanzas, asesorías y los recursos necesarios para la culminación de este proyecto, por su inmensa paciencia y confianza. ¡Muchas Gracias!

A mi comité tutor, Dra. Lilian González Segura y la Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig por sus consejos, asesorías y retroalimentación a lo largo del proyecto dando como resultado el presente trabajo.

A mi jurado de examen por brindar su apoyo y contribución en la revisión y mejoramiento del manuscrito, por sus comentarios, preguntas y valiosa retroalimentación al presente escrito.

ÍNDICE GENERAL

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	ASPECTOS GENERALES.....	1
1.1.1	¿QUÉ SON LOS VIRUS?.....	1
1.1.2	PROTEÍNAS COMO BLOQUE DE CONSTRUCCIÓN, NÚMERO T.....	3
1.1.3	NANOPARTÍCULAS VIRALES.....	7
1.1.4	PARTÍCULAS TIPO VIRUS.....	10
1.1.5	EXPRESIÓN DE VLPs.....	13
1.2	ERITROPARVOVIRUS 1 DE PRIMATE, ANTERIORMENTE PARVOVIRUS B19.....	14
1.2.1	ESTRUCTURA GENÓMICA.....	14
1.2.2	PROTEÍNA VP2.....	16
1.2.3	PROTEÍNA VP1.....	19
1.2.4	EL GLOBÓSIDO O ANTÍGENO P.....	23
1.2.5	ENFERMEDADES CAUSADAS POR B19V.....	24
1.3	PROTEÍNAS DE FUSIÓN Y PROTEASA TEV.....	25
1.3.1	SPYTAG / SPYCATCHER.....	25
1.3.2	GFP (GREEN FLUORESCENT PROTEIN).....	27
1.3.3	PROTEASA TEV.....	29
1.4	POTENCIAL TERAPÉUTICO DE VLPs DE PARVOVIRUS B19 DISEÑADAS.....	29
2.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	33
3.	HIPÓTESIS.....	34
4.	OBJETIVOS.....	34
4.1	OBJETIVO GENERAL.....	34
4.2	OBJETIVOS PARTICULARES.....	34
5.	MÉTODOS Y MATERIALES.....	35
5.1	METODOLOGÍA GENERAL.....	35
5.2	EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA 307-ST-TEV.....	35
5.3	LIMPIEZA DE CUERPOS DE INCLUSIÓN.....	36
5.4	PURIFICACIÓN DE 307-ST-TEV.....	37
5.5	MODIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA sf-GFP-SC.....	38
5.6	EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA NUEVA PROTEÍNA sf-GFP-SC (sf-GFP-SCb) 41	
5.7	ENSAMBLE IN VITRO DE 307-ST-TEV.....	42
5.8	PROTEÓLISIS DE VLPS.....	43
5.9	CARACTERIZACIÓN DE VLPS MEDIANTE DLS.....	43

5.10	PURIFICACIÓN DE VLPS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR.....	44
5.11	FORMACIÓN DEL COMPLEJO sf-GFP-SCb: 307-ST-TEV Y FLUORESCENCIA DE VLPS 45	
5.12	CARACTERIZACIÓN POR MICROSCOPÍA DE FUERZA ATÓMICA.....	46
5.13	CARACTERIZACIÓN POR CENTRIFUGACIÓN ISOPÍCNICA.....	47
5.14	ESTABILIDAD DE 307-ST-TEV.....	48
6.	RESULTADOS.....	49
6.1	EXPRESIÓN, LIMPIEZA DE CUERPOS DE INCLUSIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS VP2 Y 307-ST-TEV.....	49
6.2	MODIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA sf-GFP-SC.....	51
6.3	EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE sf-GFP-SCb.....	53
6.4	ENSAMBLE IN VITRO DE 307-ST-TEV Y CARACTERIZACIÓN POR DLS.....	55
6.5	PROTEÓLISIS DE VLPS.....	57
6.6	CARACTERIZACIÓN DE VLPS MEDIANTE DLS.....	60
6.7	PURIFICACIÓN DE VLPS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR.....	62
6.8	FORMACIÓN DEL COMPLEJO sf-GFP-SCb CON 307-ST-TEV.....	64
6.8.1	PURIFICACIÓN DE VLPS DECORADAS POR CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR.....	65
6.8.2	FLUORESCENCIA DE VLPS Y ANÁLISIS POR SDS-PAGE DEL COMPLEJO sf-GFP-SCb:307-ST-TEV.....	68
6.9	CENTRIFUGACIÓN ISOPÍCNICA.....	73
6.10	ANÁLISIS POR AFM.....	77
6.11	ESTABILIDAD DE VLPS DE 307-ST-TEV.....	78
7.	CONCLUSIONES.....	81
8.	PERSPECTIVAS.....	82
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	83
10.	ANEXO.....	98
A.1	MATERIALES.....	98
A.2	INSTRUMENTOS Y EQUIPO.....	99
A.3	CEPAS.....	100
A.4	PREPARACIÓN DE CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES.....	100
A.5	TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES.....	101
A.6	PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO (MINIPREP).....	102
A.7	PROTOCOLO DE EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEASA TEV.....	103

RESUMEN

Las partículas tipo virus (VLPs) están constituidas por todos o algunos de los componentes estructurales de los virus. Estas partículas son de gran interés biotecnológico ya que pueden ser utilizadas como acarreadores de diversas moléculas con el fin de construir nanoreactores enzimáticos, acarreadores de epítopos antigénicos para construir vacunas, y péptidos con funciones de reconocimiento para generar tropismo artificial. La proteína VP2 de parvovirus B19 (B19V) tiene la propiedad de autoensamblarse *in vitro* para formar VLPs, mismas que guardan una gran semejanza con la cápside icosaédrica del virion nativo, la cual está constituida por 60 subunidades de proteína. Se ha demostrado que es posible presentar péptidos heterólogos en la superficie de estas partículas mediante su fusión genética en el extremo N-terminal de VP2. Sin embargo, no todos los extremos N-terminales quedan expuestos en la superficie de la partícula, presentando así una polivalencia reducida. Una forma de aumentar la polivalencia es la bioconjugación utilizando elementos que siempre se encuentren en la superficie de las partículas, como el asa 301-313 de VP2. Nuestro grupo de investigación ha demostrado que la inclusión de fragmentos heterólogos en el asa 301-313 no afecta la competencia de ensamble de las quimeras de VP2. En este proyecto se insertó el péptido SpyTag, que es parte del sistema de bioconjugación SpyTag/SpyCatcher, en el asa 301-313 seguido de un sitio de corte para la proteasa TEV (TEVp). El sistema SpyTag/SpyCatcher permite una interacción específica y covalente entre sus componentes que, al estar fusionados a otras proteínas, permite la formación de superestructuras que mantienen la funcionalidad de sus componentes. Nuestro objetivo es probar la funcionalidad del péptido SpyTag tanto en el asa íntegra como después de cortarla con TEVp. Nuestros resultados mostraron que la presencia del péptido SpyTag no afectó la competencia de ensamble de la proteína quimérica. Se demostró, además, que el corte del asa con TEVp no promueve el desensamble de las partículas.

Este estudio dejó claro que el péptido SpyTag es funcional en el asa íntegra, aunque no con la polivalencia esperada, y que, tras el corte del asa con TEVp, la funcionalidad del péptido SpyTag liberado aumenta a casi el doble y representa una tercera parte del total de la polivalencia teórica esperada la cual es de 60.

De manera global, se demostró que la inclusión de péptidos para bioconjugación en el asa 301-313 es una buena opción para la construcción de nuevos biomateriales.

ABREVIATURAS USADAS

AFM: Microscopía de fuerza atómica

ARG: L-Arginina

B19V: Parvovirus B19

BSA: Albúmina sérica bovina

DLS: Dispersión dinámica de luz

eGFP: Proteína Verde Fluorescente mejorada (del inglés, "*enhanced*")

GFP: Proteína verde fluorescente

GuHCl: Cloruro de guanidinio

H: Horas

H1N1: Influenza A subtipo H1N1

IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

ON: Incubación 12 horas durante la noche (del inglés "Overnight")

PBS: Solución amortiguadora fosfatos-salina

PLA2: Fosfolipasa A2

s: Segundos

SARS: Del inglés *Severe Acute Respiratory Syndrome*, síndrome respiratorio agudo severo causado por un virus de la familia de los coronavirus

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

SEC: Del inglés *Size Exclusion Chromatography*, cromatografía de exclusión molecular

sf-GFP: Proteína Verde Fluorescente con superplegamiento (del inglés, "*superfolder*")

TEM: Microscopía electrónica de transmisión

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

VLPs: Partículas Tipo Virus

VP1: Proteína viral 1

VP1u: Región Única de VP1

VP2: Proteína viral 2

VSR: Virus sincicial respiratorio

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ASPECTOS GENERALES

1.1.1 ¿QUÉ SON LOS VIRUS?

Los virus infectan a plantas, bacterias, hongos y células animales; son patógenos intracelulares obligados, no se consideran "vivos" en un sentido estricto, pues no pueden replicarse sin ingresar a una célula huésped y usar la maquinaria de ésta para la propia replicación y ensamble de nuevas partículas. Los virus y sus anfitriones han coexistido y coevolucionado, demostrando una notable plasticidad en su estructura y una dinámica metaestable, incluido el ensamblaje y desensamblaje coordinado con la entrega exitosa de la molécula cargo, que es su material genético. Los virus caracterizados al momento representan solo una fracción de la diversidad viral presente en la biosfera (Douglas *et al.*, 2006).

Los virus pueden estar rodeados o no, por una envoltura viral que facilita su fusión e infección a la célula huésped, la envoltura puede provenir de la membrana plasmática, aunque también del retículo endoplasmático de la célula, del complejo de Golgi o incluso de la membrana nuclear, dependiendo del virus (Louten *et al.*, 2016). Los virus consisten típicamente en una cápside proteica que encapsula a su material genético. Las subunidades proteicas de la cápside se ensamblan con una estructura tridimensional precisa, y albergan en su interior el material genético, ADN o ARN (Singh *et al.*, 2006).

Los procesos de infección del virus o los ciclos de vida del virus difieren mucho entre las especies, pero hay seis etapas básicas: (1) fijación selectiva debido a la interacción, unión y/o fusión entre la superficie de la cápside viral y los receptores específicos en la superficie celular del huésped, (2) penetración de un virus en una célula huésped a través de fusión de membrana o endocitosis mediada por receptor, (3) liberación de ácido nucleico genómico viral en la célula huésped debido a la degradación viral de la cápside por enzimas virales o enzimas huésped, (4) replicación del virus y ensamblaje en la célula huésped, (5) modificación postraducciona l de las proteínas virales; y finalmente, (6) la liberación de virus de

la célula huésped. Para algunos virus, como el VIH, se invierte el orden de las etapas (5) y (6) (Chen *et al.*, 2010).

Los avances recientes en microbiología estructural han aumentado los datos estructurales recopilados mediante técnicas de difracción de rayos X, microscopía crioelectrónica y resonancia magnética nuclear. Actualmente, la prevención y el control de epidemias y pandemias causadas por virus infecciosos, como el H1N1, el VIH, el SARS y la gripe aviar, son de suma importancia. Como una infección comienza con la unión a la superficie entre un virus y una célula huésped, es importante construir y visualizar la topología y morfología de la superficie de los virus para comprender la unión a la superficie y la interacción posterior. Esta información también es crucial para comprender el mecanismo molecular que da lugar al ensamblaje de las cápsides del virus y al empaquetado de ADN o ARN.

Diferentes virus presentan diferentes propiedades estructurales, por ejemplo:

A. Cápsides virales simples con una o dos proteínas principales (por ejemplo, parvovirus, papilomavirus, circovirus, calcivirus, virus de la hepatitis E y poliomavirus) (**Figura 1**).

B. Cápsides virales complejas con varias capas de proteína, codificadas por muchos ARNm distintos, o generadas a partir de una única poliproteína (por ejemplo, Picornavirus).

C. Cápsides virales con envolturas de lípidos que incluyen una bicapa lipídica obtenida de la célula huésped, así como glicoproteínas virales (por ejemplo, virus de la influenza, el virus del sarampión, el virus de las paperas, el virus de la rabia y el virus del Ébola, VIH, Hepatitis C) (Shirbaghaee *et al.*, 2015).

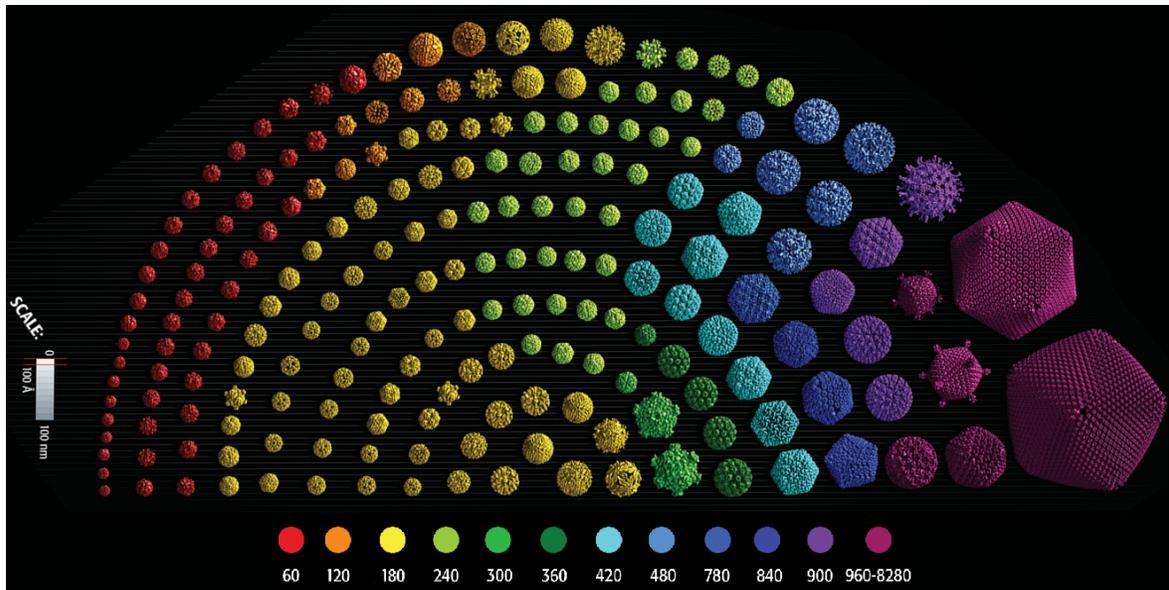


Figura 1. 200 virus icosaédricos depositados en el PDB. Los virus más pequeños forman cápsides perfectamente simétricas que consisten en 60 copias de una sola proteína pequeña, que proporciona suficiente espacio interno para contener un genoma diminuto que codifica solo un par de proteínas. El parvovirus, por ejemplo, tiene unos 20 nm de diámetro, el virus de la influenza y el VIH tienen un tamaño más típico, unos 100 nm de diámetro. Sin embargo, algunos virus miden significativamente más de 100 nm. Los poxvirus, como el virus variola que causa la viruela, pueden alcanzar los 400 nm de longitud, y los filovirus, como el peligroso virus del Ébola y el virus de Marburg, tienen sólo 80 nm de diámetro, pero se extienden en largos filamentos que pueden alcanzar longitudes de más de 1000 nm. Estos virus usan uno o más tipos de proteínas en arreglos cuasi-simétricos para construir cápsides aún más grandes que encierran genomas más grandes y complejos. Debajo se muestra el esquema de colores que resalta el número de subunidades en cada cápside. Figura modificada de: <https://pdb101.rcsb.org/learn/paper-models/quasisymmetry-in-icosahedral-viruses>.

1.1.2 PROTEÍNAS COMO BLOQUE DE CONSTRUCCIÓN, NÚMERO T

Las estructuras biológicas a escala nanométrica, como los microtúbulos, los filamentos de actina, los flagelos y las cápsides virales, se construyen mediante la oligomerización controlada de subunidades proteicas plegadas de manera similar, utilizando un pequeño número de interacciones de tipo no covalente bien definidas (puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals, puentes salinos, e interacciones hidrofóbicas) en un proceso altamente específico. Esto da como resultado oligómeros que son regulares en apariencia y biológicamente funcionales. Para lograrse deben ser estables, estar bien formados/plegados y deben hacerse en un intervalo de tiempo apropiado. Proteínas pequeñas ($N \sim 64$

aminoácidos), alcanzan su estructura terciaria en tiempos del orden de milisegundos ($t \sim 10^{-3}$ s), en tanto que proteínas más complejas se pliegan en tiempos no mayores a algunas decenas de segundos ($t \sim 10^1$ s), plegamiento que ocurre a la par del tiempo de síntesis, (Olivares-Quiroz y García-Colín, 2004).

Esto no cambia en nada que algunas proteínas posean la información necesaria para buscar su conformación nativa aun estando solas. Las proteínas que facilitan el plegamiento mejoran la cinética y evitan la formación de estructuras no nativas. La energía de plegamiento de una proteína se asemeja a un embudo donde la proteína se pliega por rutas diferentes dependiendo de la conformación en la que se encuentre en el estado desplegado, cada ruta seguirá la línea de menor energía desde esta conformación hasta la estructura nativa. Este proceso se inicia con interacciones de corto alcance que forman estructuras secundarias en regiones locales del polipéptido. Estas interacciones no covalentes se establecen entre las cadenas laterales próximas. Algunos residuos tienen tendencia a formar estructuras en hélice-alfa, hebra-beta o giros. Estos residuos se conocen como sitios de iniciación. El siguiente paso es la formación del *estado de glóbulo fundido*, el cual se produce tras un colapso hidrófobo y contiene la mayor parte de las estructuras secundarias presentes en la estructura nativa, pero posee muchas interacciones incorrectas. Las interacciones de medio y largo alcance se forman mediante el reordenamiento del estado de glóbulo fundido. Las últimas interacciones en formarse, en caso de existir, son los puentes de disulfuros (Alas-Guardado *et al.*, 2011).

El concepto de autoensamblaje sugiere que la información requerida para una determinada forma es una propiedad que recae en las subunidades mismas, gracias a interacciones de enlace bien definidas y que se refleja en estructuras simétricas, por ejemplo, la simetría helicoidal, que encontramos en microtúbulos, flagelos y virus en forma de rodillo, forma que surge de operaciones simples de traslación y rotación; cada subunidad, con la excepción de los extremos, se encuentra en un entorno idéntico (Prevelige, 1998).

Una gran cantidad de virus médicamente significativos tienen cápsides con simetría icosaédrica, formada por subunidades idénticas, con enlaces idénticos a sus vecinos y 60 subunidades con ejes de simetría de orden 5, 3 y 2.

En la década de 1960, Donald Caspar y Aaron Klug descubrieron que los virus construyen cápsides más grandes al abandonar la necesidad de una simetría perfecta entre subunidades para empaquetar el ácido nucleico viral, esto se logra al utilizar varias copias de las subunidades para formar un nuevo bloque de construcción más grande para el icosaedro. Cada cara del icosaedro se compone de al menos 3 subunidades de proteína en las cápsides más pequeñas, y cada una de ellas, a su vez, participa en la formación de los ejes de simetría de orden 2, 3 y 5. Para que una matriz de caras de un poliedro, o facetas, adquiriera la estructura típica del icosaedro se requiere que la interacción entre las facetas genere cierta curvatura, por ejemplo, en un pentámero de facetas. Sin embargo, esta curvatura puede ser eliminada si incluimos una sexta faceta. La inclusión de estas unidades de hexámeros entre unidades pentaméricas promueve el crecimiento del icosaedro, y el número de hexámeros que hay entre pentámeros. El número de triangulación, o número T, nos dice que tan grande es una cápside, por ejemplo, para $T=1$, las cápsides contienen 60 subunidades, de modo que el número T nos indica qué múltiplo de 60 tiene una cápside (**Figura 2**). Como consecuencia de este empaque entre hexámeros y pentámeros formados por trímeros iguales, se generan interacciones cuasiequivalentes entre sus bordes. Los virus han adoptado una serie de estrategias para mantener la estabilidad y flexibilidad de las cápsides virales, y aunque es evidente que la información requerida para un ensamblaje exitoso está codificada en las subunidades, se desconoce la forma exacta en que se controla este cambio (Prevelige, 1998).

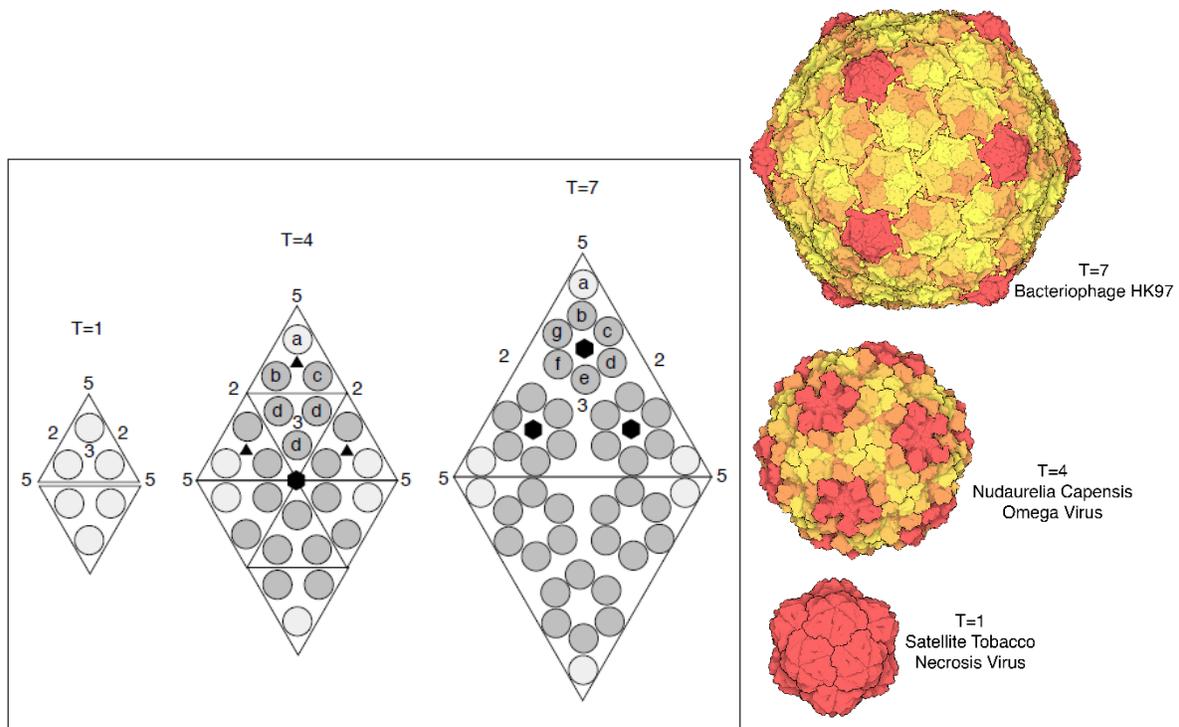


Figura 2. Geometría de las cápsides icosaédricas. Las caras triangulares representan dos de las 20 caras icosaédricas. Los ejes de simetría de cinco, tres y dos veces están rotulados numéricamente para la cara superior; T = 1 contiene 60 subunidades idénticas en entornos idénticos. T = 4 contiene un total de 240 (60x4) subunidades, y las subunidades etiquetadas a, b, c y d están en distintas posiciones relacionadas con la simetría. T = 7 contiene 420 (60x7) subunidades. Las subunidades en diferentes posiciones relacionadas con la simetría se etiquetan como a – g. Las subunidades más oscuras participan en interacciones hexaméricas. Los números T representan el número de triangulación, donde hay T diferentes entornos de subunidades (Prevelige, 1998). De lado izquierdo: virus satélite de necrosis del tabaco (PDB: 2buk); virus del enanismo arbustivo del tomate (PDB: 2tbv), virus omega de *Nudaurelia capensis* (PDB: 1ohf); bacteriófago HK97 (PDB: 1ohg). Figuras tomadas de (Prevelige, 1998; <http://pdb101.rcsb.org/mo/125>).

La oligomerización se puede dividir en dos fases cinética y termodinámicamente distintas: la fase de nucleación y la fase de crecimiento, siendo la fase de nucleación termodinámicamente desfavorable. Esta barrera energética de nucleación surge por el costo entrópico de inmovilizar las subunidades y porque el cambio conformacional requerido para formar el núcleo supera a la energía de enlace entre subunidades obtenida durante su formación, aunque se estabilizan

después por su interacción hidrófoba con el medio acuoso, lo que contribuye a la minimización de energía del sistema.

Estos factores hacen que sea difícil poblar los intermediarios necesarios para formar el núcleo y da como resultado la aparición de una concentración crítica, por debajo de la cual no se produce la oligomerización. Una vez que se ha formado el núcleo, la posterior adición de subunidades se vuelve favorable, porque las subunidades pueden formar múltiples interacciones de enlace, y el crecimiento ocurre (Prevelige, 1998).

1.1.3 NANOPARTÍCULAS VIRALES

Las nanopartículas virales (VNP) son bloques de construcción basadas en virus: bacteriófagos, virus de plantas o animales; y pueden contener o no ADN. Estos sistemas dinámicos de autoensamblaje forman estructuras altamente simétricas, monodispersas y polivalentes. Esto es, su tamaño es homogéneo y, al estar compuestos de unidades estructurales repetitivas, sus grupos químicos se repiten, lo que permite obtener un número definido distribuido de manera precisa en la superficie de los viriones (**Figura 3**) (Steinmetz *et al.*, 2010).

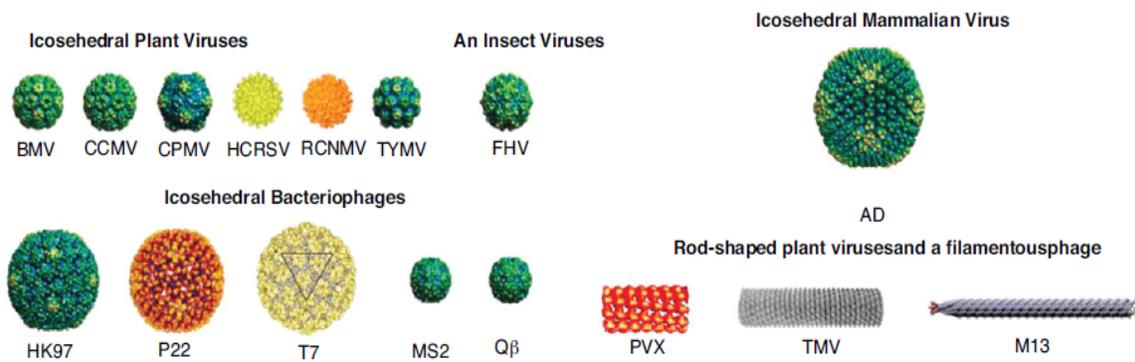


Figura 3. Nanopartículas virales (VNP) derivados de virus icosaédricos. Virus de plantas: Virus del mosaico de bromo (BMV), virus del moteado clorótico del caupí (CCMV), virus del mosaico del caupí (CPMV), virus de la mancha anular clorótica del hibisco (HCRSV), virus del moteado necrótico del trébol rojo (RCNMV), virus del mosaico amarillo del nabo (TYMV); Virus de insecto: virus Flock House (FHV); Bacteriófagos: HK97, P22, T7, MS2 y Qβ. P22 y T7 son fagos cabeza-cola, con las colas no mostradas. Virus de mamíferos: adenovirus (AD). Virus en forma de rodillo y filamentosos: virus de la papa X (PVX), virus del mosaico del tabaco (TMV), bacteriófago M13. Figura tomada de (Yildiz *et al.*, 2011).

Las estrategias que involucran la ingeniería de virus han demostrado un potencial considerable al contar con una variedad de formas, tamaños, estabilidades, propiedades dinámicas y reactividades químicas. Gracias a las estructuras tridimensionales de virus reportadas en el PDB, ha sido posible identificar o modificar aminoácidos en su distribución espacial precisa y aprovechar la polivalencia en la cápside viral para la bioconjugación (Singh *et al.*, 2006).

Las proteínas tienen numerosos residuos funcionales activos que se pueden conjugar, como los grupos amino y carboxilo terminales, o aminoácidos como la lisina, cisteína, tirosina, aspartato y glutamato. Estos pueden funcionalizarse con anticuerpos, oligonucleótidos, péptidos, proteínas, carbohidratos, reactivos fluorescentes y fármacos utilizando químicos como: *N*-hidroxisuccinimidil éster (NHS), maleimida, isotiocianato y carbodiimida (Lee *et al.*, 2011). Además, estos métodos se pueden utilizar para incorporar grupos funcionales sintéticos, como el tirosindiazonio y la oxima-hidrozona (**Figura 4**) (Yildiz *et al.*, 2011).

Aunque la conjugación de sustancias orgánicas se requiere efectuar en posiciones que permitan el acceso a los reactivos orgánicos sin impedimento, sin destruir la estructura o impedir el ensamblaje de las proteínas, puede resultar costoso además de requerir el análisis posterior a la reacción exitosa, para verificar mediante métodos de caracterización los efectos sobre la morfología, tamaño o composición de las VLP. Si se pretende realizar modificaciones químicas en la superficie del virus, los virus no envueltos pueden representar el sistema de elección (Mejía-Méndez *et al.*, 2022).

Los aminoácidos expuestos en la superficie viral también pueden modificarse mediante mutagénesis dirigida al sitio, e incluso introduciendo aminoácidos sintéticos en el proceso de traducción, enfoque usado para expandir el número de los grupos funcionales para una conjugación química posterior (Fischlechner *et al.*, 2007).

La modificación de la proteína viral mediante ingeniería genética es otro método empleado para la introducción de péptidos funcionales, aunque existen ciertas limitaciones con respecto al tamaño de los péptidos que pueden introducirse en las proteínas de la cápside.

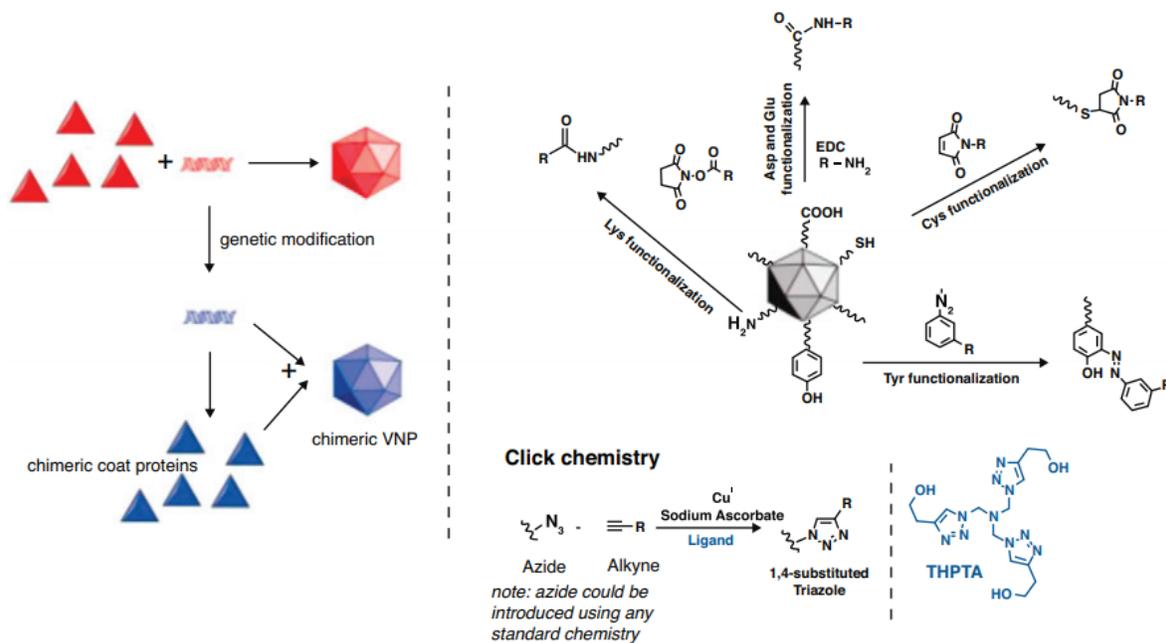


Figura 4. Manipulación genética y químicas en la investigación biomédica. Ver Texto. Figura modificada de (Yildiz *et al.*, 2011).

La capacidad de ser un nanocontenedor con base en proteínas oligoméricas naturales no es exclusiva de los virus, arquitecturas similares en el mundo biológico existen: lumazina sintasa, acetiltransferasa, las ferritinas, proteínas de choque térmico, encapsulinas. Estos nanocontenedores clínicamente útiles deberían tener los siguientes atributos: no ser patógenos, ser específicos para ciertos tipos de células, tejidos u órganos, y deben producirse fácilmente en grandes cantidades (Tariq *et al.*, 2022).

La administración de nanopartículas tiene distintas ventajas en comparación con la administración tradicional de otras biomoléculas, incluyendo una mayor vida útil en circulación y una mejor especificidad tisular. Al entrar en el cuerpo, tienen que viajar el tiempo suficiente en el sistema circulatorio para llegar al tejido objetivo, evitando su absorción fuera del objetivo, su unión a proteínas séricas, su degradación enzimática y la activación del sistema inmunológico, lo que terminaría prematuramente su viaje. Son necesarios estudios que describan el comportamiento de tales plataformas *in vivo*, para determinar las características farmacocinéticas: como su absorción, distribución en órganos, metabolismo, y

tasas de eliminación. Se plantean preocupaciones aún por investigar como la biodegradabilidad, ya que debe haber un equilibrio adecuado entre la penetración/acumulación en el tejido y el aclaramiento sistémico; la estabilidad, inmunogenicidad y reproducibilidad debido a formulaciones complejas de múltiples componentes. Así como una evaluación toxicológica de acuerdo con las dosis/concentraciones de exposición, frecuencia de exposición, y mecanismos de acción (Steinmetz *et al.*, 2010) (Levasseur *et al.* 2021).

Es difícil predecir con precisión las propiedades *in vivo* de una formulación particular y, por lo tanto, cada una debe evaluarse caso por caso antes de realizar pruebas clínicas.

1.1.4 PARTÍCULAS TIPO VIRUS

Las partículas tipo virus (VLP) se consideran un subconjunto de VNP, son complejos de una o más proteínas estructurales de virus expresadas en sistemas heterólogos, que tienen la propiedad inherente del autoensamble, tienen un tamaño y morfología homogéneas casi idénticas a las de los viriones, la partícula vírica morfológicamente completa e infecciosa, con excepción de su material genético. Así, las VLP mantienen la mayoría de sus propiedades estructurales de reconocimiento celular sin ser infecciosas, conservan su afinidad por los receptores celulares, los mecanismos de entrada a la célula huésped y la inmunogenicidad (Kushnir *et al.*, 2012; Mejía-Méndez *et al.*, 2022).

Las VLPs provocan respuestas tanto humorales como celulares en el sistema huésped, respuestas estimuladas debido a sus epítopos antigénicos repetitivos, por su baja polidispersidad, pueden usarse directamente como vacunas o como andamios para la presentación de antígenos (Mohsen y Bachmann, 2022). Si bien no todos los intentos de usar VLPs han tenido éxito en provocar respuestas inmunitarias efectivas (Grgacic y Anderson, 2006; Ludwig *et al.*, 2007), uno de los casos de mayor éxito es la vacuna contra el virus del papiloma humano (HPV), cuyas VLPs inducen respuestas inmunitarias protectoras sólo con la proteína estructural L1 (Villa *et al.*, 2005; Garland *et al.*, 2007). A pesar de décadas de esfuerzo, se han obtenido pocas licencias para vacunas hechas de VLPs. Entre

estas vacunas autorizadas y disponibles comercialmente se encuentran: Engerix-BR[®] (GlaxoSmithKline) y Recombivax HBR[®] (Merck & Co) contra el virus de la hepatitis B, GardasilR[®] (Merck & Co) y CervarixR[®] (GlaxoSmithKline) contra el virus del papiloma humano, HecolinR[®] (Xiamen Innovax Biotech Co.) contra el virus de la hepatitis E (Dai et al., 2018), y Mosquirix[®] (GlaxoSmithKline Inc.) contra la malaria (Mohsen et al., 2017).

Las VLPs podrían superar varios problemas que suelen estar asociados a las vacunas tradicionales, específicamente, la naturaleza infecciosa relacionada con las vacunas vivas atenuadas, la reversión a una forma virulenta, el riesgo de mutación, la inmunogenicidad reducida de la vacuna inactivada, la toxicidad inestable, el bajo rendimiento y el largo tiempo de formulación (Tariq et al., 2022).

Algunas aproximaciones para crear VLPs quiméricas incluyen: la conjugación mediante enlaces fuertes no covalentes (p. ej. afinidad biotina – avidina), fusión genética, decoración covalente mediante la formación espontánea del enlace isopeptídico (HaloTag[®], SNAP-Tag[®], sortasa), incluyendo el sistema que se ocupó en el presente trabajo (Catcher-Tag) (Brune y Howarth, 2018).

Las VLPs que presentan proteínas o péptidos heterólogos en su superficie mediante la fusión genética a proteínas se denominan VLPs quiméricas. Para que las quimeras sean exitosas, deben identificarse múltiples posiciones de fusión (asas superficiales, extremos N/C externalizados) para producir VLPs multicomponentes que mantengan su competencia de ensamble y evitar el plegamiento incorrecto del péptido heterólogo o la formación de partículas con tamaño heterogéneo (Takahashi et al., 2008; Soto et al., 2010; Shirbaghaee et al., 2015; Bustos-Jaimes et al., 2017; Mejía-Méndez et al., 2022; Tariq et al., 2022).

Las VLPs se pueden desmontar y reensamblar convenientemente cambiando las condiciones ambientales, como el valor de pH del medio, la temperatura, la concentración de sales y la presencia de aditivos. Esta aplicaciónística brinda la posibilidad para la encapsulación, lo cual es apropiado para el diseño de nanocontenedores (Carette et al., 2007; Fischlechner et al., 2007; Lee et al., 2011; Steinmetz et al., 2010).

Los investigadores han diversificado el uso de estos vehículos naturales para múltiples aplicaciones como la administración de fármacos, inmunoterapia con el suministro de antígenos y anticuerpos para el tratamiento de distintos tipos de cáncer como el colorrectal, de páncreas y de cuello uterino (Mejía-Méndez *et al.*, 2022); nanorreactores enzimáticos, imagenología médica (agentes de contraste, de tomografía por emisión de positrones, fluoróforos); se han utilizado ampliamente para construir vacunas humanas contra diversos virus patógenos emergentes como el SARS-CoV-2. Otras vacunas en desarrollo están dirigidas contra enfermedades no infecciosas, como la hipertensión, el Alzheimer, la adicción a la nicotina, las alergias y la diabetes (Singh *et al.*, 2006; Yoo *et al.*, 2011; Mejía-Méndez *et al.*, 2022; Mohsen y Bachmann, 2022). (Figura 5).

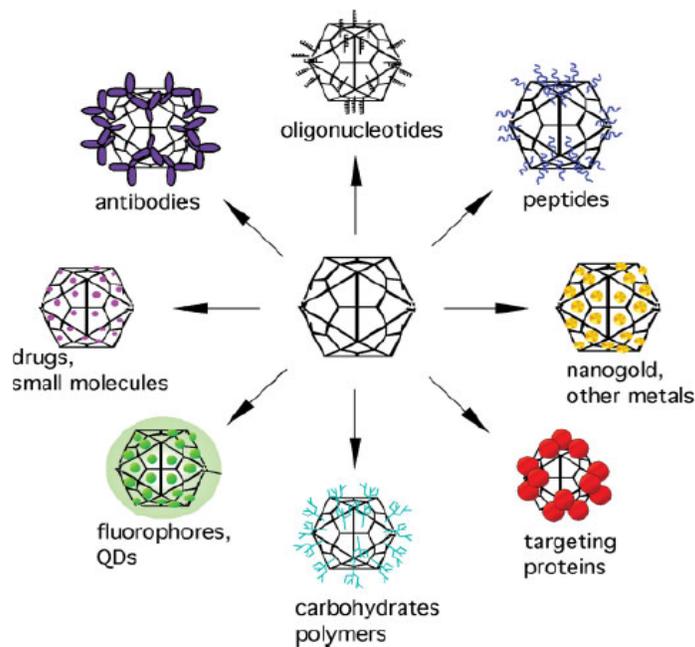


Figura 5. Aplicaciones de partículas virales en nanotecnología. Usando la cápside viral como plataforma, se puede unir o mostrar genéticamente una variedad moléculas en la superficie. Figura tomada de (Singh *et al.*, 2006).

Hemos pasado de ver los virus solo como enemigos hostiles a verlos y usarlos como un recurso potencialmente vasto y beneficioso, gracias a la posibilidad de impartir nuevas funciones a la arquitectura de las cápsides, combinando lo mejor de la evolución y el diseño inteligente. El potencial de desarrollar una amplia gama de nanoestructuras para aplicaciones biomédicas es un hecho, el límite será la creatividad (Douglas *et al.*, 2006).

1.1.5 EXPRESIÓN DE VLPs

La selección del vector de expresión heteróloga es uno de los principales factores en la generación de VLPs. Los métodos de expresión reportados son bastante reproducibles, tanto bacterias como levaduras son plataformas fáciles y rápidas para la producción de proteínas recombinantes útiles en la producción de VLPs simples de virus no envueltos, pero carecen de la capacidad de producir estructuras complejas y modificaciones post-traduccionales.

Las características benéficas del uso de sistemas bacterianos para la producción de VLP incluyen: (a) fácil manipulación, (b) alta tasa de expresión, (c) tasa de crecimiento rápida, (d) estabilidad genética y (e) simplicidad de expresión. Las desventajas incluyen (a) inmunogenicidad deficiente, (b) incapacidad para desarrollar proteínas recombinantes con modificaciones postraduccionales similares a las de los mamíferos, (c) problemas de solubilidad de las proteínas, (d) incapacidad para crear los enlaces disulfuro correctos, y (e) presencia de endotoxinas bacterianas o lipopolisacáridos en la preparación de proteínas recombinantes (Ding *et al.*, 2018; Kushnir *et al.*, 2012; Tariq *et al.*, 2022).

La producción de proteínas recombinantes en levadura es otra opción popular dada la facilidad de expresión, la capacidad de escalar y el costo de producción. Sin embargo, factores tales como la glicosilación adecuada de proteínas, el plegado correcto, así como la optimización de codones, puede hacer declinar por otros sistemas de producción alternativos. Tanto las levaduras, como el sistema de células de insecto y baculovirus, están limitados a las modificaciones de “alta manosa”. Los sistemas de expresión de baculovirus han permitido otras modificaciones post-traduccionales como la acilación, manosilación y la formación de enlaces disulfuro. El principal inconveniente del sistema baculovirus es la etapa de purificación, ya que estos se producen al mismo tiempo que las VLPs (Grgacic y Anderson, 2006; Tariq *et al.*, 2022).

En los sistemas de expresión de plantas puede obtenerse un alto rendimiento a un bajo costo de producción, mejora la formación de enlaces disulfuro, la estabilidad y el plegamiento adecuado de las VLP se logran con patrones de N- y O-glicosilación, aunque pueden diferir en la glicosilación de antígenos. Estas

modificaciones post-traduccionales están implicadas en la adhesión celular, focalización de proteínas y respuestas inmunes (Brune y Howarth, 2018).

Los sistemas de cultivo de células de mamíferos son las más adecuadas para la producción de estructuras complejas, porque replica fielmente los patrones de glicosilación humana, pero son un sistema menos controlable y más costoso para la producción pues los rendimientos obtenidos son generalmente mucho más bajos en comparación con otros sistemas (Grgacic y Anderson, 2006).

A pesar de la alta eficiencia del proceso de autoensamblaje dentro de las células de los sistemas de expresión heterólogos eucariotas, muchos usos biomédicos y biotecnológicos de las VLPs requieren eliminar contaminantes potenciales de su cavidad interna. Una estrategia simple para eliminar dichos contaminantes es desensamblar los VLP antes de la etapa de purificación seguido de un reensamblaje de las partículas, aunque estos pasos adicionales de ensamble/desensamble pueden limitar las ventajas obtenidas de la expresión heteróloga eucariótica, incluyendo el costo operacional involucrado de tales pasos.

La tecnología de partículas similares a virus (VLP) presenta una plataforma alternativa para desarrollar vacunas eficaces para combatir enfermedades infecciosas de gran preocupación, y avanza en paralelo con las vacunas basadas en ARNm y vectores virales (Tariq *et al.*, 2022).

1.2 ERITROPARVOVIRUS 1 DE PRIMATE, ANTERIORMENTE PARVOVIRUS B19

1.2.1 ESTRUCTURA GENÓMICA

A mediados de la década de 1970, una viróloga, observó una reacción anómala del suero de un donante de sangre normal (que ocupaba la posición 19 en la placa B) en un ensayo de contrainmunolectroforesis y radioinmunoensayo para la hepatitis B. Al observarse al microscopio, se descubrió el parvovirus humano. Recientemente su nombre cambió a Eritroparvovirus 1 de primate (Heegaard y Brown, 2002; Young *et al.*, 2004), pero nos referiremos a él como B19V para acortar la nomenclatura.

Los parvovirus (el nombre proviene de *parvum*, palabra latina para pequeño) forman cápsides pequeñas, de aproximadamente 18-26 nm de diámetro, contienen un genoma de ADN monocatenario de aproximadamente ~5000 bases, encerrado dentro de una cápside de icosaédrica (T = 1), no tienen envoltura e infectan vertebrados e insectos.

La cápside icosaédrica del B19V está formada por dos proteínas estructurales, la proteína viral 1 (VP1) de 83 kDa y la proteína viral 2 (VP2) de 58 kDa, surgen de la traducción con sitio alternativo de inicio en el mismo marco de lectura abierto, de modo que VP1 es igual a VP2 en el extremo C-terminal, la diferencia entre estas proteínas recae en la presencia de 227 aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal de VP1: la región única de VP1 (VP1u) (Ozawa *et al.*, 1987; Ozawa y Young 1987; Carter y Tatterstal, 1991).

El genoma monocatenario de B19V consta de 5596 nucleótidos y tiene dos principales marcos de lectura abiertos (ORF) y también dos ORF más pequeños. La transcripción produce al menos nueve transcripciones de ARNm superpuestas, todas inician desde el único promotor P6 en el extremo izquierdo del genoma (Heegaard y Brown, 2002). La transcripción única del ORF principal izquierdo, se traduce en la proteína no estructural (NS1), que conserva múltiples funciones replicativas (unión a ADN, ATPasa, actividad de helicasa y transcripción), y es citotóxica para las células huésped (Ozawa *et al.*, 1988; Moffat *et al.*, 1998). Mientras que cuatro transcripciones superpuestas del ORF principal derecho se traducen en las proteínas estructurales VP1 y VP2. Además, cuatro transcripciones de los ORF más pequeños se traducen en proteínas de 11 kDa y 7,5 kDa, cuyas propiedades biológicas aún no se han determinado, pero se sabe que la proteína 11 kDa expresada en abundancia induce una apoptosis progresiva de la célula huésped (Ozawa y Young 1987; Chen *et al.*, 2010). La proteína estructural más pequeña VP2 (58 kDa) forma el 95% de la proteína de la cápside; el resto es VP1 (84 kDa) (Cotmore *et al.*, 1986; Ozawa & Young, 1987).

Se han determinado las estructuras tridimensionales de la cápside de varios parvovirus, B19V humano (Agbandje *et al.*, 1994; Kaufmann *et al.*, 2004), parvovirus canino (CPV) (Tsao *et al.*, 1991; Xie y Chapman, 1996), virus de la panleucopenia

felina (FPV) (Agbandje *et al.*, 1993), MVM (Llamas-Saiz *et al.*, 1997), *Galleria mellonella densovirus* (Simpson *et al.*, 1998), virus adenoasociado 2 (AAV-2) (Xie *et al.*, 2002), AAV-4 (Padron *et al.*, 2005), y parvovirus porcino (PPV) (Simpson *et al.*, 2002).

La superficie externa de B19V tiene diferencias comparado con otros parvovirus, es estructuralmente más similar a AAV-2, mientras que MVM se asemeja más a CPV y FPV (Kauffman *et al.*, 2004) (Figura 6).

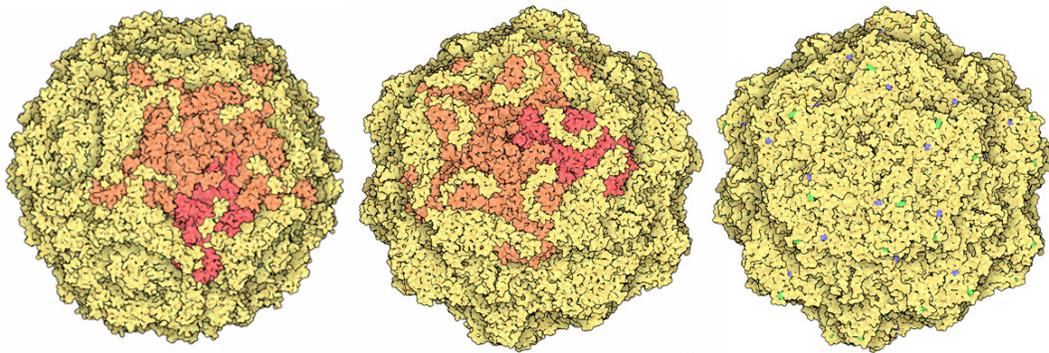


Figura 6. De izquierda a derecha: B19V, FPV y CPV. El capsómero de 5 unidades está coloreado en naranja, y en rojo una subunidad. Dos mutaciones en la superficie de CPV, mostrados en azul y verde, determinan su huésped. FPV y CPV se unen al receptor de transferrina en las superficies celulares. La superficie de B19V es significativamente diferente a las de otros parvovirus al carecer de espículas prominentes en los ejes de orden de simetría 3, implicados en el reconocimiento del huésped y antigenicidad; tiene protrusiones adyacentes a estos ejes de simetría y cavidades en los ejes de simetría de orden dos; por el eje de orden cinco, asoma un motivo similar a una flor en su centro, la cual está rodeada por una depresión en forma de cañón. Figura modificada de: <http://pdb101.rcsb.org/motm/125>.

1.2.2 PROTEÍNA VP2

VP2 es capaz de autoensamblar ya sea sola o con VP1, para formar partículas similares a virus (VLPs), dichas partículas observadas por microscopio electrónico miden de 19-23 nm de diámetro con simetría icosaédrica (Heegaard y Brown, 2002).

El plegamiento de VP2 conforma una estructura supersecundaria tipo “jelly roll”, que consta de un barril antiparalelo de ocho hebras beta dispuestas en dos

láminas denominadas BIDG y CHEF, de cuatro cadenas. Dos tercios de la estructura está hecha de grandes inserciones que conectan las hebras del barril.

Estas inserciones o asas se encuentran en la superficie viral (Kauffman *et al.*, 2004) (**Figura 7**). La secuencia de péptidos de la estructura central del barril beta barril está muy conservada a comparación de las inserciones de superficie (Carter y Tatterstal, 1991).

La estructura cristalográfica de las VLP de B19V producidas exclusivamente a partir de VP2 se ha reportado a una resolución de 3.5 Å (PDB 1S58) (Kaufmann *et al.*, 2004). B19V produce naturalmente cápsides vacías en individuos infectados, y se han comparado con VLPs de VP2 por criomicroscopía electrónica (cryoEM) (Kaufmann *et al.*, 2008). La mayoría de los 554 residuos de la proteína de la cápside B19V VP2 fueron trazables en la densidad electrónica, a excepción de 18 residuos N-terminales, probablemente porque su posición en el virión no es simétrica y no está suficientemente limitada; y 13 aminoácidos (aminoácidos 301-313) que forman la punta de un asa superficial adyacente a el eje de orden tres. Las regiones con los factores de temperatura más altos coinciden con los bucles expuestos (Kaufmann *et al.*, 2004).

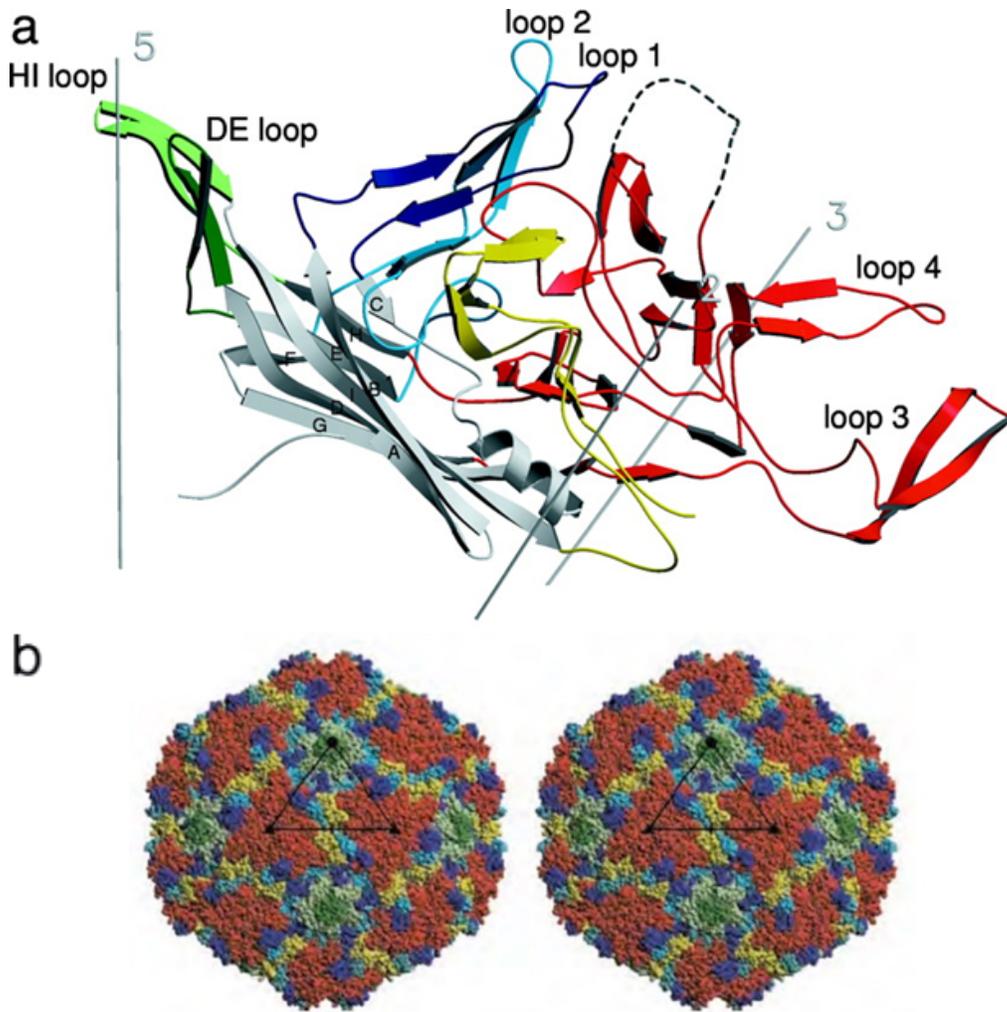


Figura 7. Estructura secundaria del parvovirus B19. (a) Diagrama de listón de VP2. Las hebras del barril- β (gris) están etiquetadas secuencialmente de la A a la I. Las asas superficiales que conectan las hebras del barril están etiquetadas por color: azul oscuro, asa BC; verde oscuro, asa DE; azul claro, asa EF; rojo, asa GH; verde claro, asa HI; amarillo, Carboxilo terminal. La posición del asa desordenada (aminoácidos 301–313) (línea discontinua) se modeló en función de AAV-2. (b) Topografía de la superficie de B19V. Los bucles de superficie están codificados por colores según el diagrama de listón. El asa desordenada ha sido omitida. Figura modificada de (Kauffman *et al.*, 2004).

La principal diferencia entre las B19V nativo (con ADN o vacío) y las VLPs de VP2 radica alrededor del eje de orden 5 donde es espacialmente posible que todos los extremos amino terminales en estas zonas sean externalizados al mismo tiempo en los viriones (Kaufmann *et al.*, 2008) (Figura 8).

El canal estrecho en cada vértice del eje de orden cinco, que se conecta con el interior de la partícula es una característica estructural común en los parvovirus, se ha implicado en la externalización y el empaquetado del genoma (Farr y Tattersall, 2004; Cotmore y Tattersall, 2014). En las cápsides de B19V, el extremo externo del canal está cerrado, sin embargo, la presencia de tres residuos de glicina consecutivos puede proporcionar la flexibilidad requerida para abrir el canal y permitir la liberación del ADN viral.

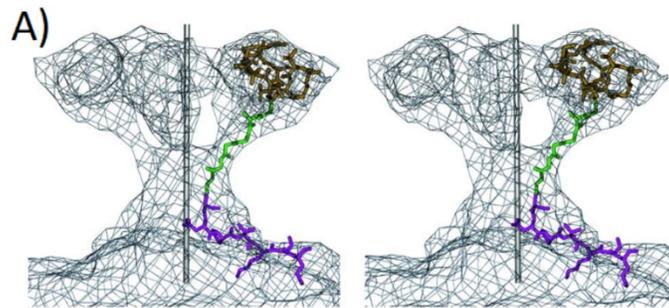


Figura 8. Vista estereoscópica de la diferencia de densidad electrónica positiva entre B19V nativo y VLPs de VP2 a través del eje de orden cinco. Panel A. La diferencia de densidades en el eje de simetría orden 5 implica que en el caso de los viriones de B19V existe material atravesando el poro que se forma en ese eje. El N-terminal de VP2 hasta el residuo 18 se modeló dentro de es densidad electrónica. La región rica en glicina (residuos 17 a 12), mostrada en color verde, diverge del eje central del canal y se conecta con la diferencia de densidad en el exterior de la partícula viral. Los 11 residuos N-terminales restantes se podrían acomodar en la parte externa y se muestran en color dorado. Figura modificada de (Kauffman *et al.*, 2008)

1.2.3 PROTEÍNA VP1

VP1 es idéntica a VP2 con la excepción de una región amino terminal adicional de 227 aminoácidos, la llamada región única de VP1 (VP1u) (Ozawa y Young 1987). Aunque esta región es un componente menor de la cápside, la respuesta inmune dominante contra B19V es provocada por la región VP1u, que alberga fuertes epítopos neutralizantes (Saikawa *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 1995; Zuffi *et al.*, 2001). Una pobre respuesta inmune contra VP1u se ha relacionado con infecciones persistentes (Kurtzman *et al.*, 1989).

Se había debatido la localización topológica de VP1u, pues en viriones B19V, la actividad de fosfolipasa de VP1u no es detectable y tampoco es accesible a anticuerpos. Por otro lado, cápsides vacías derivadas de baculovirus (y algunos viriones aislados de plasma humano) pueden inmunoprecipitarse con anticuerpos contra la región VP1u (Carter y Tatterstal, 1991; Rosenfeld *et al.*, 1992). Inclusive las quimeras de B19V son enzimáticamente activas e inmunogénicas (Brown *et al.*, 1994; Miyamura *et al.*, 1994). Por lo tanto, estas regiones parecen estar siempre accesible en la VLP (Kauffman *et al.*, 2008).

Esto se halla en concordancia con otros parvovirus, donde la región VP1u no es accesible en la superficie de la cápside, pero puede quedar expuesto *in vitro* mediante tratamientos con calor leve o pH bajo (Vihinen-Ranta *et al.*, 2002) e *in vivo* durante el tráfico de virus a lo largo de la vía endocítica (Leisi *et al.*, 2013).

VP1u tiene funciones importantes en el ciclo de vida del virus. Alberga un motivo de fosfolipasa A2 (PLA2) que se requiere para la infección y está localizado entre los aminoácidos 130 a 195 en VP1, dependiente de Ca^{2+} (Dorsch 2002); entre los diferentes parvovirus, constituyen el grupo XIII de la superfamilia PLA2 (Canaan *et al.*, 2004). Se cree que la exposición intracelular de la PLA2 es importante para el escape endosómico (Zadori *et al.*, 2001; Canaan *et al.*, 2004; Dorsch *et al.*, 2002; Farr *et al.*, 2005). Mutantes de B19V en el motivo PLA2 mostraron una disminución significativa en la infectividad viral y falla en la transferencia del genoma viral desde los lisosomas tardíos al núcleo (Zadori 2001; Zhi 2006; Filippone *et al.*, 2008). Se cree que la actividad PLA2 puede estar involucrada en la inducción de reacciones autoinmunes y procesos inflamatorios (Tzang *et al.*, 2007).

Al igual que otros parvovirus, B19V ingresa a la célula a través de endocitosis mediada por clatrina (Quattrocchi *et al.*, 2012), pero a diferencia de estos, B19V no requiere acidificación endosómica para la exposición a VP1u, pues ocurre prematuramente en la membrana celular, para promover la captación del virus. En B19V la región VP1u se vuelve accesible solo después de la unión del receptor Gb4Cer en la superficie celular (Bonsch *et al.*, 2008, 2010), suena razonable que, para ser completamente inmunogénico, VP1u tendría que estar expuesto de manera estable en la superficie celular.

Para el B19V el aumento de temperatura o acidificación *in vitro* lleva simultáneamente a la exposición de VP1u como del genoma viral sin el desmontaje de la cápside (Ros *et al.*, 2006). La resistencia natural de las cápsides del B19V aparentemente sería insuficiente para evitar la externalización del ADN viral en el entorno ácido endosómico. Inesperadamente las cápsides unidas al receptor son notablemente más resistentes que las cápsides nativas o desprendidas (Bonsch *et al.*, 2010). Después de la unión al antígeno P de eritrocitos (globósido), solo o en conjunto con otras estructuras moleculares en la superficie celular, el B19V adquiere una estabilidad notablemente superior.

Después del escape endosomal y posterior transporte intracelular, se evidencia una translocación coordinada de cápsides virales con el genoma descubierto pero asociado a cápside en el núcleo de las células infectadas. Se ha sugerido un segundo reordenamiento de la cápside que ocurre después del escape endosómico en el citoplasma. Las cápsides son detectables por el anticuerpo VP1u, e indetectables por un anticuerpo conformacional (Sun *et al.*, 2019), con sensibilidad a la digestión por nucleasas y está fosforilado (Caliaro *et al.*, 2019) (**Figura 9**). Leisi y colaboradores (2016) demostraron que VP1u contiene un dominio de unión a un receptor (RBD) que media la captación del virus, y que está presente en los linajes eritroides permisivos, limitando el tropismo viral y patogénesis por B19V a células en etapas de diferenciación eritroide dependiente de eritropoyetina. Los receptores celulares que median la entrada de B19V aún no son del todo claros, y se han propuesto varios candidatos, incluido el globósido, el autoantígeno Ku80 y la integrina $\alpha 5\beta 1$. Otro receptor ha sido recientemente identificado, AXL Tirosina Quinasa (Ning *et al.*, 2023).

Los aminoácidos N-terminales externalizados de VP1u, 5–80, son responsables de la unión e internalización celular. Los residuos 5–68 se definieron además como el dominio mínimo de VP1u para la entrada a las células progenitoras eritroides mediante la unión e internalización (Leisi *et al.*, 2016).

Recientemente el grupo de trabajo logró la expresión bacteriana y el autoensamblaje *in vitro* de VLPs hechas únicamente por la proteína VP1. El correcto plegado de la región única se comprueba al conservarse la actividad de

fosfolipasa A2 (PLA2) y la hemaglutinación de glóbulos rojos observada para el virión B19 (Soto-Valerio *et al.*, 2022). Sánchez-Rodríguez con la proteína VP2 obtuvo por difracción circular resultados que concuerdan con la estructura reportada para la proteína VP2, conformada principalmente por 8 hojas β antiparalelas, una hélice α y varias asas. Estos resultados permitieron confirmar que durante el ensamblaje se tiene un buen plegamiento de la proteína (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012).

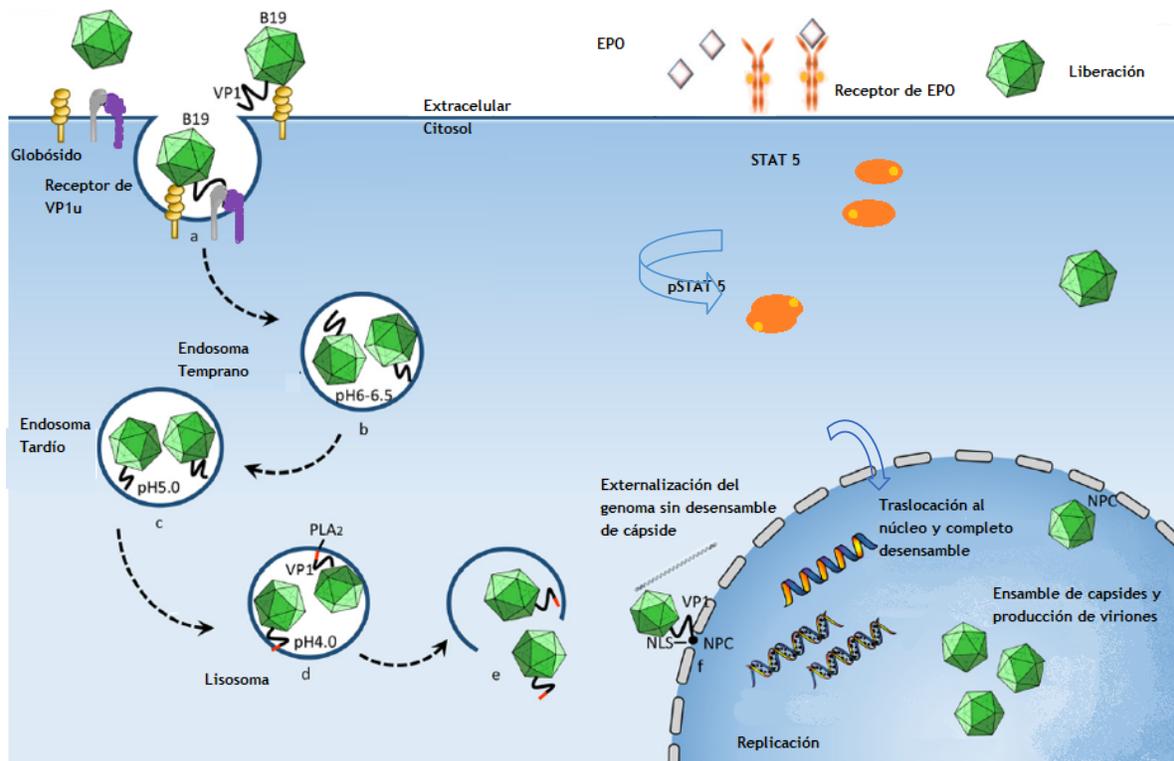


Figura 9. Esquema del proceso de infección por B19V, mediado por la vía endocítica dependiente de clatrina. a) Internalización mediada por los receptores. b) Se forma el endosoma temprano (pH 6.0-6.5). c) Transformación a endosoma tardío en condiciones de pH más bajo (pH 5). d) Transformado en lisosoma con activación de la fosfolipasa A2 (PLA2) (pH 4.0). e) El PLA2 activado ayuda al escape lisosómico y los virus se liberan en el citosol. f) Los virus son transportados hacia el núcleo, con externalización de genoma asociado a cápside. En otros parvovirus existe una señal de localización nuclear (NLS) en VP1. El movimiento de microtúbulos y de filamentos de actina están involucrados en todo el proceso de infección viral, desde el endosoma temprano hasta la periferia nuclear. El genoma viral comienza a replicarse y ensamblarse después del tráfico a través del complejo de poros nucleares (NPC) y se liberan fuera de la célula. Imagen modificada de (Tu *et al.*, 2015). Cuando se activa el receptor de Eritropoyetina (EPO) se fosforila STAT5. La translocación de pSTAT (molécula común de las vías estimuladas por eritropoyetina e hipoxia) en el núcleo es esencial para la formación de un complejo replicativo funcional (Manaresi y Gallinella, 2019).

1.2.4 EL GLOBÓSIDO O ANTÍGENO P

Inicialmente se demostró que B19V aglutinaba glóbulos rojos humanos (Brown y Cohen 1992), y se planteó la hipótesis de que la misma aglutinina podría actuar como el receptor de la célula huésped en las células progenitoras eritroides; un exceso de antígeno P o anticuerpo monoclonal anti-P pudo proteger a los progenitores eritroides de la infección con B19V, lo que demostró que el antígeno P es un receptor de B19V (Brown *et al.*, 1993). La hemaglutinina se identificó como globósido glucosfingolípido (globotetraosilceramida, Gb4Cer) (Brown *et al.*, 1993, 1994; Agbandje *et al.*, 1994). Gb4Cer está presente en la membrana de los eritrocitos y sus progenitores de médula ósea (células huésped naturales), también en una multitud de otros tipos de células en las que B19V no puede replicarse: megacariocitos, células endoteliales y miocitos fetales (Takahashi *et al.*, 1990; Cooling *et al.*, 1995; Heegaard y Brown, 2002).

Los estudios *in vivo* han sugerido que Gb4Cer es necesario para que B19V se una a las células, pero no es suficiente para la entrada celular (Weigel-Kelley *et al.*, 2001). Se propuso que las integrinas $\alpha 5\beta 1$ funcionan como co-receptores para la entrada viral, aunque el mecanismo no se aclaró (Weigel-Kelley *et al.*, 2003), así también el autoantígeno Ku80 (Munakata *et al.*, 2005). Ku es una proteína heterodimérica de unión a ADN que consta de una subunidad de 70 kDa (Ku70) y una de 80 kDa (Ku80), con probable función de transducción de señales al ser una quinasa y como receptor de adhesión para fibronectina, por lo que podría facilitar la unión del virus a ciertos tipos de células (Munakata *et al.*, 2005).

El tropismo celular de B19V no podría explicarse si Gb4Cer fuera la única molécula receptora. Por tal motivo, se realizaron varios experimentos para conocer la base molecular del tropismo: ensayos en fase sólida con liposomas marcados con fluorescencia o cápsides marcadas con yodo para caracterizar la especificidad de la unión, resonancia plasmática superficial en capas de lipídicas, e incluso microcalorimetría de titulación isotérmica. Todos estos estudios no confirmaron la unión de Gb4Cer a cápsides recombinantes (Kaufmann *et al.*, 2005). Otro estudio informa la unión de VLPs de B19V a Gb4Cer en bicapas lipídicas compatibles (Nasir *et al.*, 2014). Estos resultados contradictorios pueden reflejar la existencia de una

interacción que ocurre solo en condiciones específicas, como la agrupación de receptores, el entorno molecular circundante, o con ciertas conformaciones estructurales.

Bieri y colaboradores, eliminaron el gen B3GalNT1 que codifica la enzima globosida sintasa (cataliza la transición de la globotriaosilceramida (Gb3) a Gb4) en células UT7/Epo (línea celular susceptible de infección por B19V), estas células *knockout* (KO) no fueron afectadas en su viabilidad y ni en su proliferación celular. Inesperadamente, la unión del virus, la internalización y la focalización nuclear no fueron perturbadas en estas células. Sin embargo, la transcripción de NS1 falló y, en consecuencia, la replicación del genoma viral falló. A pesar de la expresión de Gb4, algunas líneas celulares no pueden infectarse porque el virus no puede internalizarse, lo que sugiere que otras moléculas receptoras son críticas para la internalización del virus en las células susceptibles (receptor de VP1u). Esto explica por qué las personas con una mutación rara en el gen B3GalNT1 no expresan Gb4Cer y son naturalmente resistentes a la infección (Brown *et al.*, 1994; Bieri *et al.*, 2019).

1.2.5 ENFERMEDADES CAUSADAS POR B19V

La mayoría de los casos de infección por B19V son asintomáticos. El signo clínico más común de infección es el eritema infeccioso, o quinta enfermedad, un exantema infantil o sarpullido leve principalmente observable en las mejillas. La quinta enfermedad toma su nombre de una lista de exantemas infantiles comunes, nombrados en el orden de descripción: 1^{era} sarampión, 2^{da} escarlatina, 3^{ta} rubéola, 4^{ta} enfermedad de Duke, 5^{ta} por B19V, y 6^{to} roséola (Young *et al.*, 2004).

La infección por B19V en una mujer embarazada, seguida de la transmisión transplacentaria al feto, puede provocar un aborto espontáneo o hidropesía fetal. El parvovirus infecta el hígado fetal, sitio de producción de eritrocitos durante el desarrollo temprano. La hidropesía es el resultado de anemia severa y quizás también miocarditis, que contribuyen a la insuficiencia cardíaca (Rayment *et al.*, 1990).

En contraste con el curso leve de la enfermedad en niños, en adultos, la infección puede causar artropatía clínicamente significativa. El B19V puede persistir a niveles bajos en la médula, las articulaciones y el hígado de las personas normales durante muchos meses después de la infección. También se ha asociado a hepatitis y miocarditis, y el papel del B19V en la miocarditis aguda o crónica podría ser relevante, aunque aún se debate (Young *et al.*, 2004; Manaresi y Gallinela, 2019).

La infección por B19V puede precipitar o exacerbar la artritis reumatoide juvenil, lupus eritematoso y fibromialgia. Afecta gravemente a personas cuyos glóbulos rojos tienen periodos cortos de vida, pues provoca un cese abrupto de la producción de glóbulos rojos, lo que provoca anemia severa precipitando una insuficiencia cardíaca congestiva, accidentes cerebrovasculares, y secuestro esplénico agudo. Esto afecta a personas que padecen anemia falciforme, deficiencia de piruvato quinasa, esferocitosis hereditaria, β -talasemia intermedia, y multinuclearidad eritroblástica hereditaria (Rayment *et al.*, 1990). El tema de las manifestaciones clínicas ha sido revisado exhaustivamente por: Qiu *et al.*, 2017.

El virus se transmite por gotitas respiratorias y por productos sanguíneos, especialmente concentrados de factor VIII y factor IX. La ausencia de una envoltura lipídica y su estabilidad genómica hacen que los parvovirus sean notoriamente resistentes a la inactivación por calor y a los detergentes (Young *et al.*, 2004). El diagnóstico de laboratorio de la infección por parvovirus B19 se basa en pruebas serológicas y de ADN, porque la propagación del virus en cultivo de tejidos estándar es difícil (Young *et al.*, 2004).

Existen vacunas efectivas disponibles para parvovirus animales, sin embargo, aún no existe para el humano. Una vacuna contra B19V es un objetivo alcanzable y técnicamente factible, aunque es necesario afinar detalles en términos de inmunogenicidad y ausencia de reactogenicidad.

1.3 PROTEÍNAS DE FUSIÓN Y PROTEASA TEV

1.3.1 SPYTAG / SPYCATCHER

La mayoría de los patógenos bacterianos tienen estructuras filamentosas largas conocidas como pili, involucradas en la colonización y motilidad. En las bacterias

gram-negativas, el pili se forma típicamente por interacciones no covalentes entre las subunidades de pilina. Por el contrario, los pili de gram-positivos se forman por polimerización covalente de subunidades de pilina. Una definición breve para el pili sería, todos los organelos de superficie celular poliméricos y no flagelares (Telford *et al.*, 2006).

El pili Gram (+) se ensambla mediante enzimas transpeptidasas codificadas en la bacteria llamadas sortasas. Estas enzimas reconocen motivos de secuencia específica en las subunidades de pilina, alargan el oligómero de pili mediante la adición progresiva de subunidades unidas por enlaces isopeptídicos intermoleculares, y luego atan todo el ensamblaje al peptidoglicano de la pared celular. Por lo tanto, los pili consisten en múltiples copias covalentemente unidas de una sola columna central, a la que se pueden agregar algunas proteínas accesorias (Kang *et al.*, 2007).

Se ha explorado el dominio CnaB2 de la proteína de unión a fibronectina FbaB, una proteína del pili de cepas invasivas de *S. pyogenes*. A través de ingeniería de proteínas, CnaB2 se separó en péptidos más pequeños para lograr formar un enlace isopeptídico entre moléculas distantes (Zakeri *et al.*, 2012). Se describió al sistema de 13 aminoácidos (SpyTag) que forma un enlace covalente con su proteína asociada de 138 aminoácidos (SpyCatcher) (**Figura 10**). Este sistema se emplea para la bioconjugación ortogonal de proteínas y fue usado en este trabajo.

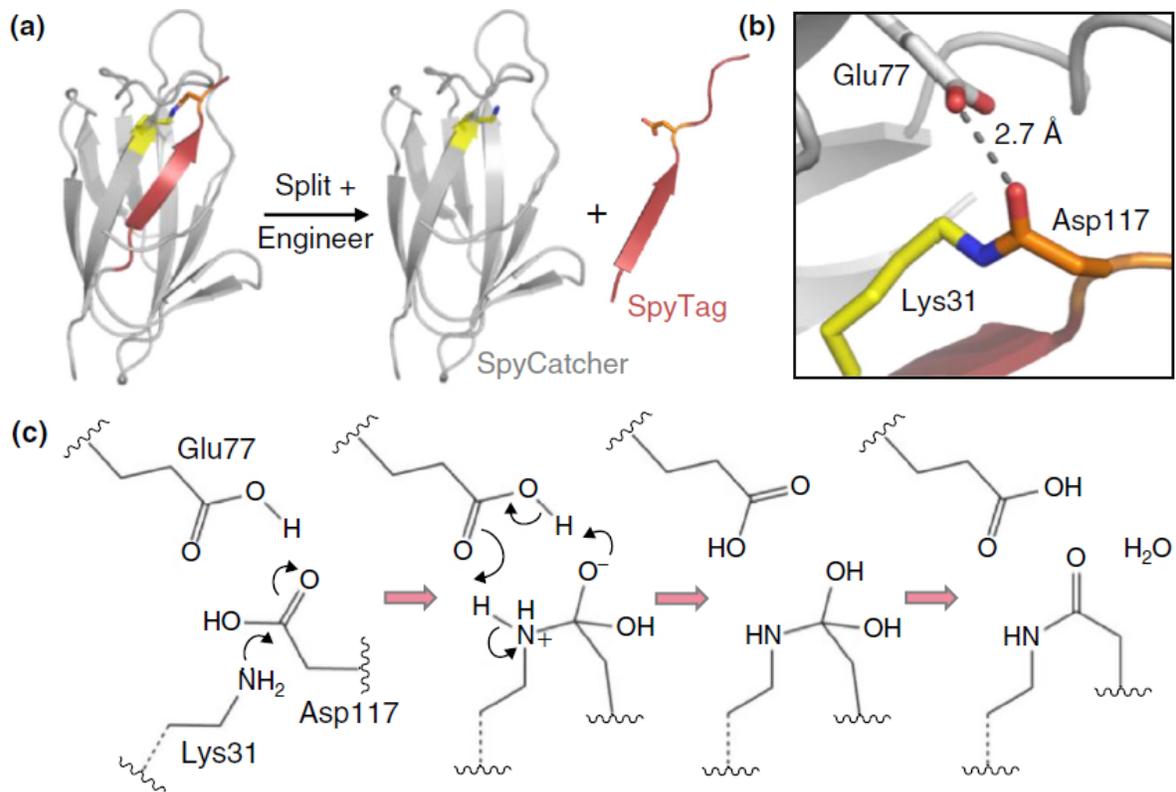


Figura 10. Sistema SpyTag – SpyCatcher. A) Caricatura de la construcción. CnaB2 se diseccionó en un fragmento mayoritario N-terminal (SpyCatcher, gris) y un péptido C-terminal (SpyTag, rojo). Los residuos que forman el isopéptido se muestran como barras (PDB 2X5P y 4MLI). B) Residuos clave en el entorno para la formación del enlace isopeptídico. Asp117 (naranja) y Lys31 (amarillos), Glu77 (gris). C) Mecanismo de reacción. Una amina desprotonada de Lys31 ataca nucleofílicamente al carbonilo del Asp117, seguido de transferencia de protones que involucran a Glu77, lo que conduce a un intermedio tetraédrico neutro que luego libera agua y forma el enlace amida. Imagen modificada de (Reddington y Howarth, 2015).

1.3.2 GFP (GREEN FLUORESCENT PROTEIN)

El uso de proteínas fluorescentes para marcar proteínas es de vital importancia en la investigación de todas las ramas de la biología. Hay proteínas fluorescentes en el infrarrojo cercano, proteínas bioluminiscentes como la luciferasa, y proteínas marcadas con radioisótopos, aunque se requiere de una tomografía por emisión de positrones computarizada para verlas. Contar con una amplia gama de estos compuestos posibilita a los investigadores diseñar experimentos para aprovechar métodos ópticos sofisticados. La proteína verde fluorescente (GFP) hallada en la medusa *Aequorea victoria*, es una proteína monomérica soluble que emite

fluorescencia a una longitud de onda de 508 nm cuando es excitada con luz ultravioleta (Reid y Flynn, 1997), consta de 238 aminoácidos y su peso molecular se halla entre los 30 kDa. Su estructura terciaria se forma por 11 hebras beta que constituyen un barril y una hélice alfa en el centro. Su función es transducir, mediante transferencia de energía, la quimioluminiscencia azul de otra proteína, aequorina, en luz fluorescente verde. La emisión de fluorescencia se debe a la presencia de un cromóforo con una estructura de anillo de imidazolona, específicamente una *p*-hidroxibencilidenoimidazolinona formada a partir de los residuos 65-67, los cuales corresponden a Ser-Tyr-Gly en la proteína silvestre (Tsien *et al.*, 1998).

La GFP tolera la fusión N-terminal y C-terminal de una amplia variedad de proteínas, muchas de las cuales retienen la función nativa y sirve como reportero fluorescente (Yang *et al.*, 1996). Se han desarrollado versiones más robustas de la GFP, como la super folder GFP (sf-GFP) desarrollada por Pédelacq y colaboradores (2006), quienes obtuvieron una proteína muy robusta que se pliega adecuadamente, incluso cuando se encuentra unida a proteínas mal plegadas; también muestra una mayor tolerancia a la permutación circular, mayor resistencia a agentes desnaturalizantes, así como una mayor velocidad de plegamiento. La sf-GFP presenta varias mutaciones que en conjunto impiden la dimerización, contribuyen al plegamiento, fluorescencia y velocidad de plegamiento mediante la formación de una red electrostática más extensa que incluye a aminoácidos que anteriormente no interactuaban.

La GFP es una proteína muy versátil utilizada diversos campos y también se ha empleado en la producción de VLPs. Leona Gilbert y colaboradores fusionaron la proteína verde fluorescente mejorada (eGFP) en el extremo amino terminal de VP2 del B19V, y se ensambló en VLPs fluorescentes. Las VLPs fluorescentes tuvieron la capacidad de internalizarse en células cancerosas y transportarse al núcleo a través de la red de microtúbulos (Gilbert *et al.*, 2005). En este trabajo utilizaremos a la sf-GFP como reportero para la evaluar la modificación de la superficie de las cVLPs de B19V.

1.3.3 PROTEASA TEV

La proteasa del virus del mosaico del tabaco (TEV) tiene un motivo de reconocimiento de 7 aminoácidos: EXXYX(Q/S)G (donde X puede ser cualquier aminoácido) y la proteólisis tiene lugar entre los residuos Gln o Ser y Gly. El sitio de reconocimiento óptimo es ENLYF(Q/S)G con alta especificidad, esta proteasa adopta un plegamiento similar al de la tripsina, pero posee una tríada catalítica poco convencional en la que un residuo de Cys reemplaza a la Ser. La producción a gran escala de la proteasa TEV (TEVp) estuvo inicialmente limitada por su baja solubilidad después de la expresión bacteriana, ya que forma agregados insolubles. Luego se implementaron diferentes enfoques para resolver este problema, como el uso de diferentes cepas de *E. coli* y el control de la temperatura en el crecimiento bacteriano. Otro enfoque ampliamente utilizado es fusionarlo a etiquetas de solubilidad: poli-histidina o poli-arginina, proteína de unión a maltosa (MBP), glutatión S-transferasa (GST), Tiorredoxina (TRX), Streptag II, SUMO, NusA, super folder GFP, o proteínas chaperonas (Cesaratto *et al.*, 2016). Blommel y colaboradores (2007) unieron a TEVp con la proteína de unión a maltosa (MBP) para promover la solubilidad, eliminaron ciertos residuos C-terminal nocivos, hicieron modificaciones en el plásmido de expresión y usaron el método de autoinducción para aumentar sustancialmente la expresión de la TEVp soluble. En este proyecto se utilizó esta proteasa para generar un corte en una quimera de la proteína VP2 ensamblada en VLPs.

1.4 POTENCIAL TERAPÉUTICO DE VLPs DE PARVOVIRUS B19 DISEÑADAS

B19V no está glicosilada ni tiene enlaces disulfuro, por lo que su expresión en bacterias está limitada solo porque las proteínas de la cápside se acumulan como cuerpos de inclusión, se puede escalar su producción fácilmente a un bajo costo, es resistente a la desnaturalización y puede tolerar procesos de purificación agresivos (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012).

La capacidad de modificar el N-terminal se planteó por primera vez cuando se fusionó genéticamente una enzima en la superficie de una VLP, sustituyendo a

VP1u, parcial o totalmente, coexpresada con VP2 en células de insecto. Formas truncadas de VP1 ganan competencia para el autoensamblaje a medida que se acorta VP1u (Miyamura *et al.*, 1994; Wong *et al.*, 1994). Desde entonces varios grupos han aprovechado la presencia de los extremos N-terminales en la superficie externa de la cápside B19V como andamio para la presentación de antígenos: determinantes antigénicos del virus del dengue 2 (DEN-2), *Bacillus anthracis*, virus del herpes simple 1 (HSV-1), virus de la hepatitis del ratón (MHV). (Brown *et al.*, 1994; Amexis y Young, 2006; Ogasawara *et al.*, 2006).

Nuestro grupo de investigación ha descrito el replegamiento y ensamblaje de VLPs in vitro a partir de VP2 desnaturalizada y expresada en *E. coli* (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012, 2016). Mediante este método de replegamiento y ensamble se han presentado péptidos antigénicos de la glicoproteína F del VSR en el N-terminal (Morán-García *et al.*, 2016). En otro acercamiento para funcionalizar partículas, se unió la α -glucosidasa Ima1p de *Saccharomyces cerevisiae*, mediante el sistema SpyTag- SpyCatcher. El péptido SpyTag se fusionó genéticamente en el extremo N de VP2 y la proteína expresada se ensambló en VLPs. La glucosidasa no se repliega bajo condiciones desnaturalizantes, por lo que se fusionó con su contraparte bioortogonal el dominio SpyCatcher para conjugarse posteriormente (Cayetano *et al.*, 2018).

Recientemente se fusionaron múltiples neoepítomos a los extremos N de VP2, los neoepítomos Tmtc2, Gprc5a y Qars, y la survivina, un antígeno asociado a tumores. Las VLPs administradas a ratones a los que previamente se les habían implantado células 4T1, un modelo de carcinoma mamario, retrasaron significativamente el crecimiento del tumor. Además, también se redujo la macrometástasis pulmonar induciendo respuestas proliferativas específicas de los linfocitos T, CD8 y CD4. Este es un resultado alentador, ya que el carcinoma de mama es una de las formas de cáncer más letales (Jiménez-Chávez *et al.*, 2019).

Similar al enfoque anterior para hacer VLPs quiméricas, se fusionaron en el N-terminal 2 epítomos del dominio extracelular dirigidos al receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1R): los péptidos P8 y 249. IGF-1R se sobreexpresa en aproximadamente el 50% de los cánceres de mama y

desempeña un papel central en el crecimiento celular, la metástasis y la angiogénesis. Las partículas aplicadas como profiláctico protegieron contra la formación de tumores y el crecimiento de células 4T1 inoculadas en ratones. (Salazar-González *et al.*, 2019).

Otra posición interesante para explorar reside en el C-terminal puesto que sus últimos cuatro aminoácidos se hallan apuntando al núcleo interno de la cápside, lo que hace de este sitio un lugar atractivo para incorporar moléculas que deban estar dentro de la cápside. Lamentablemente, aún no se dispone de ejemplos de moléculas funcionales en el extremo C-terminal de VP2 (Sánchez-Moguel *et al.*, 2023).

Un acercamiento más para funcionalizar esta partícula reside en el uso de las asas superficiales para la inserción de péptidos o proteínas funcionales. Aunque la cápside se estabiliza entrelazando moléculas de VP2 vecinas a través de las asas superficiales, no todas estas participan en contactos intermoleculares. Ya que no existe garantía de que el péptido unido al extremo N-terminal de VP2 se muestre en la superficie de las VLPs, se evaluaron las asas superficiales.

Anteriormente en el grupo de trabajo (Aguilar, 2014) se evaluaron cuáles serían las asas más factibles de ser modificadas en B19V. Se consideraron las siguientes características: exposición superficial, movilidad térmica (factores B altos), participación en contactos en las intercaras, y la existencia de evidencia evolutiva de modificaciones en las secuencias de dichas asas (mediante alineamiento con secuencias de virus relacionados) (Kauffman *et al.*, 2004). De acuerdo con la evaluación es posible la modificación de los residuos en las asas 62-75, 265-271 y 301-313. Nuevamente mediante el método de replegamiento en condiciones desnaturalizantes y autoensamble, se presentó un péptido heterólogo de 64 residuos de la proteína F del virus sincicial respiratorio humano (RSV) residuos 215-278 en el asa 62-75, el cual incluye el sitio antigénico II de este virus (Santillán-Uribe *et al.*, 2015). También se insertó genéticamente en el asa 301-313, a la lipasa de *Bacillus pumilus* y la proteína verde fluorescente sf-GFP (Bustos-Jaimes *et al.*, 2017), todas estas construcciones lograron ensamblarse satisfactoriamente en VLPs. Esta elección se llevó a cabo pues son monoméricas, y el plegamiento de

ambas proteínas puede rastrearse fácilmente a través de la función, por lo tanto, es necesario realizar un estudio preliminar de la capacidad de autoplegamiento de las enzimas a fusionar, así como la selección de los conectores que la flanquean.

Finalmente, B19 al ser un patógeno humano tiene potencial para el desarrollo de una vacuna anti-B19V. Desde 1991 se han obtenido VLPs provenientes de células de insecto, y se descubrió que cuanto mayor era la proporción de VP1/VP2, mayor era el título de anticuerpos neutralizantes producidos (Bansal *et al.*, 1993). Dos candidatas a vacuna han llegado a ensayos clínicos de fase I, ambas se produjeron co-infectando células de insecto con dos baculovirus recombinantes, uno que expresa VP1 y otro que expresa VP2. En 2003, se logró el desarrollo de anticuerpos neutralizantes que duraron al menos un año, aunque se suscitaron efectos adversos como dolor y enrojecimiento de leve a moderado en el lugar de la inyección y otras reacciones como dolor de cabeza, fiebre, malestar gastrointestinal y fatiga. (Ballou *et al.*, 2003). En el ensayo del 2011, se produjeron erupciones cutáneas en los vacunados y el ensayo se detuvo (Bernstein *et al.*, 2011). Los efectos adversos se atribuyeron a dos factores importantes: la actividad de fosfolipasa de la región única de VP1u (PLA2 es un alérgeno importante en el veneno de abeja), y a las proteínas contaminantes provenientes de las células de insectos. Posteriormente, en 2013, se construyeron VLPs con las proteínas VP1/VP2 expresadas en *S. cerevisiae* en lugar de células de insecto, y haciendo una mutación puntual se inactivó la actividad de PLA2, las dos posibles causas principales de la reactogenicidad encontrada en el ensayo anterior (Chandramouli *et al.*, 2013). Los estudios más recientes han producido VLPs con hasta un 25% de VP1 en la levadura *Hansenula polymorpha* u obteniendo mediante células T293 humanas VLPs con una relación VP1/VP2 cercana a uno (Shao *et al.*, 2022; Suzuki *et al.*, 2022).

Uno de los desafíos para poner en marcha la vacuna es en que no se han establecido métodos de cultivo de B19, ni modelos animales adecuados para su evaluación. Hasta donde se sabe, actualmente no hay ensayos activos para las vacunas contra B19V, su implementación no está incluida entre las prioridades de la OMS, y el interés comercial en lugar de la falta de eficacia o seguridad ha

limitado el desarrollo de una vacuna contra el parvovirus B19. Dicha vacuna podría ayudar a las personas vulnerables a la infección.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La proteína VP2, en ausencia de VP1 y del genoma del virus, es capaz de formar capsómeros capaces de ensamblarse en VLPs. Se han logrado presentar péptidos en la superficie de las VLPs de B19V mediante fusión genética como la lisozima de gallina, de 147 residuos, en el extremo N-terminal de la proteína VP2. Sin embargo, la distribución de estos extremos amino de las unidades estructurales repetitivas no es total, para una partícula de B19V representaría la cantidad de 60 sitios potenciales a ser expuestos. Buscando expandir las posibilidades, se han insertado péptidos en el asa superficial 301-313 con éxito. Para decorar las VLPs de B19V con proteínas funcionales se puede utilizar el sistema SpyTag/SpyCatcher fusionando alguno de sus componentes en dicha asa. Es posible que los componentes de este sistema tengan pocos grados de libertad estructural para llevar a cabo su interacción. Por este motivo, decidimos insertar un sitio de corte para la proteasa TEV adyacente al péptido SpyTag presentado en el asa 301-313, con el fin de liberar uno de los extremos del péptido una vez que la VLP se encuentre ensamblada, y así mejorar su capacidad de reaccionar con su contraparte SpyCatcher. Se evaluará la eficiencia de conjugación del sistema SpyTag/Spy Catcher después del corte proteolítico, mediante fluorescencia del acoplamiento de la molécula verde fluorescente. También se evaluará la estabilidad de las VLPs proteolizadas para establecer si aún pueden ser una herramienta biotecnológica.

3. HIPÓTESIS

La presentación del péptido SpyTag junto con un sitio de corte para la proteasa TEV en el asa 301-313 de VP2 no afectará el ensamblaje de esta proteína en VLPs, ni la funcionalidad del péptido para conjugarse con su par bioortogonal, el dominio SpyCatcher. El corte proteolítico con TEVp en un sitio adyacente al sitio donde se encuentra el péptido SpyTag aumentará la movilidad de este último y, en consecuencia, aumentará de manera significativa su eficiencia de reacción con el dominio SpyCatcher.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

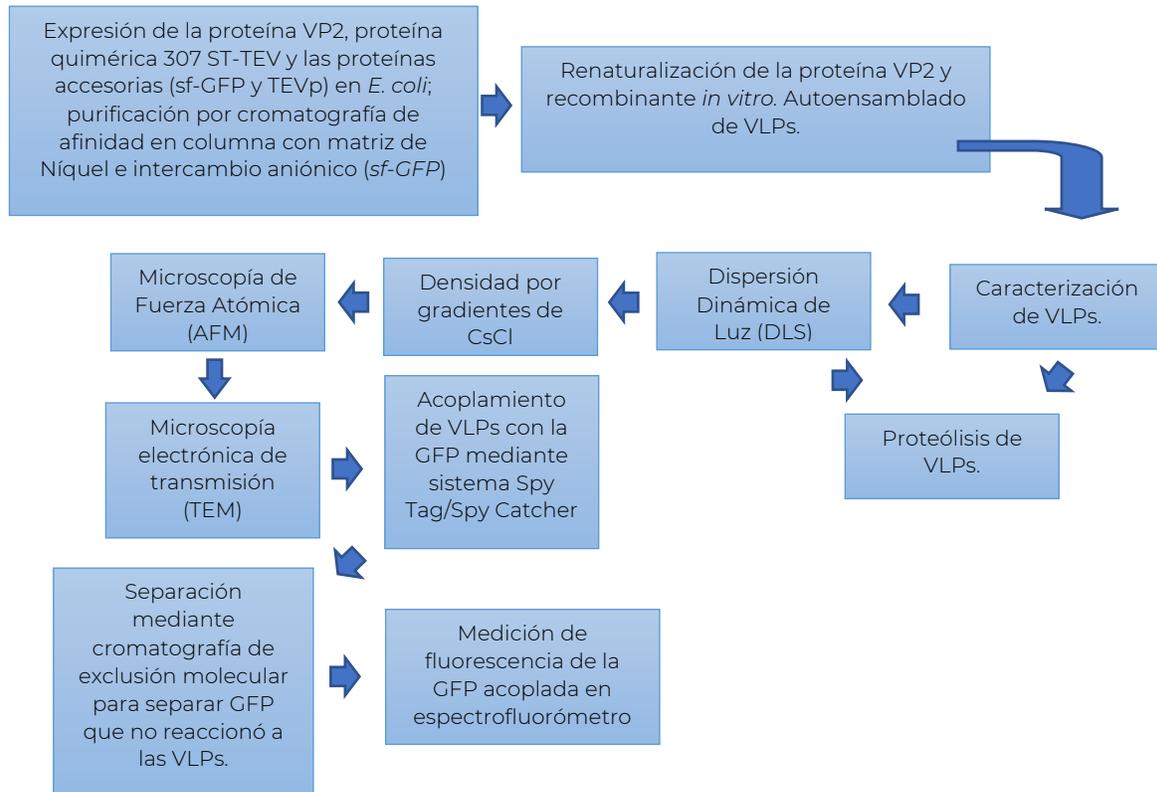
- Estudiar si el corte proteolítico de un asa superficial de VP2 que incluye al péptido SpyTag aumenta la capacidad de este último para reaccionar con su contraparte bioortogonal SpyCatcher, y establecer el efecto de dicho corte proteolítico sobre la estabilidad de las VLPs.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Expresar el gen de la quimera de VP2 que tiene el péptido SpyTag flanqueado por un sitio de corte para la proteasa TEV insertado entre los residuos 307 y 308 (denominada 307-ST-TEV), en *E. coli*, y purificar la proteína quimérica.
- Estudiar el ensamblaje de 307-ST-TEV en VLPs y caracterizarlas por métodos hidrodinámicos, microscópicos y fluorescencia.
- Expresar y purificar las proteínas accesorias sf-GFP-SC y TEVp.
- Comparar la eficiencia de conjugación antes y después del corte proteolítico
- Analizar la estabilidad antes y después del corte con la TEVp en función de la temperatura y agentes caotrópicos.

5. MÉTODOS Y MATERIALES

5.1 METODOLOGÍA GENERAL



Los Materiales, Instrumentos y equipos, y Cepas utilizadas se describen en los Anexos A.1, A.2, A.3, respectivamente.

5.2 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA 307-ST-TEV

La preparación de células quimiocompetentes se realizó de acuerdo con el Anexo A.4 y para la transformación de células quimiocompetentes se siguió el Anexo A.5. La cepa *E. coli* BL21 (DE3) se usó para la expresión de la proteína 307-ST-TEV. El plásmido pET22b(+) en el que estaba presente el gen modificado, se transformó en *E. coli* BL21(DE3) a 37 °C y 200 rpm en medio Luria Bertani, con 100 µg/mL de ampicilina para seleccionar las clonas transformadas con el vector PET22b(+).

Para asegurar la eficiencia de expresión de las clonas se probó en un ensayo de inducción a pequeña escala, después de la inducción se realizó el análisis de

proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), y se tiñó el gel con azul de Coomassie.

Posteriormente se inocularon 10 mL de medio LB-Amp. El tubo con medio de cultivo se incubó a 37°C con agitación orbital a 200 rpm durante 12 h. Se trasvasó el contenido a un matraz que contenía 200 mL de medio LB-Amp adicionando los 10 mL del preinóculo obtenido previamente. Se incubó durante 3 h a una temperatura de 37°C y con agitación orbital de 200 rpm. Para escalar la generación de biomasa se trasvasó a un matraz con 500 mL de medio LB-Amp con los 210 mL de medio de cultivo obtenidos previamente y se incubó a 37°C y con agitación orbital a 200 rpm. Al inicio de la fase exponencial (DO_{600} de 0.6 a 0.8) se añadieron 710 μ L de una solución de IPTG 0.25 M. La concentración final de agente inductor en el medio de cultivo debe ser de 0.25 mM. Se incubó a 37°C y con agitación orbital de 150 rpm. durante un periodo de tiempo de 12 h. Posteriormente se recuperó la biomasa por centrifugación a 5000 rpm por 20 min a 10°C y se determinó la presencia de las proteínas quiméricas mediante SDS-PAGE. La biomasa recuperada fue resuspendida en solución salina (0.9% m/v) con la finalidad de retirar el medio de cultivo remanente.

5.3 LIMPIEZA DE CUERPOS DE INCLUSIÓN.

El pellet obtenido se lavó con solución amortiguadora A_{LCl} (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, pH 8.0). Posteriormente la biomasa se recuperó de nuevo por centrifugación durante 15 min a 8000 rpm a 5°C. Las células recuperadas fueron resuspendidas en solución amortiguadora B_{LCl} (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, 2% v/v de Tritón-X100, pH 8.0). Las células se lisaron mediante sonicación utilizando pulsos de 9.5 s con 5 s de apagado durante 20 min en un baño de agua helada. El producto de la lisis se centrifugó durante 20 min a 10,000 rpm y 4°C. Se descartó el sobrenadante y se recuperaron los cuerpos de inclusión. La fracción obtenida previamente se solubilizó empleando la solución amortiguadora C_{LCl} (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 0.3 M, DTT 2 mM, GuHCl 5 M, pH 6.3). Para incrementar la solubilidad de las proteínas, todas las fracciones se mantuvieron en incubación durante 12 h a 30°C con agitación orbital de 200 rpm.

Los agregados de proteína y remanentes de la pared celular fueron retirados mediante centrifugación a 15000 rpm durante 15 min, y el sobrenadante fue usado para purificar la proteína. En trabajos previos (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2016; Santillán-Uribe *et al.*, 2015) se describe que las proteínas quiméricas basadas en la proteína VP2 tienden a formar cuerpos de inclusión durante la sobreexpresión en *E. coli*, incluso con distintas variables como diferentes temperaturas, tiempos de incubación, o concentraciones de IPTG. La proteína 307-ST-TEV no es la excepción.

5.4 PURIFICACIÓN DE 307-ST-TEV

La purificación de la proteína se llevó a cabo bajo condiciones desnaturizantes por cromatografía de iones metálicos inmovilizados (IMAC) usando la resina comercial Protino® Ni-TED que interacciona con la etiqueta de histidinas la proteína.

La técnica usada para la purificación fue la columna de afinidad por gravedad con un volumen de 15 mL. La matriz de la columna fue equilibrada empleando 30 mL de la solución amortiguadora A_{PU} (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 0.3 M, GuHCl 3 M, 2.5 % v/v de Glicerol, pH 7.5). Posteriormente se adicionaron a la columna 10 mL de la solución de cuerpos de inclusión solubilizados. Después se adicionó a la columna 20 mL de la solución amortiguadora B_{PU} (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 0.3 M, GuHCl 3 M, pH 7.5). Posteriormente se agregaron 20 mL de la solución amortiguadora C_{PU} (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 0.3 M, GuHCl 3 M, Imidazol 15 mM, pH 7.5). Después se agregaron 15 mL de la solución amortiguadora D_{PU} (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 0.3 M, GuHCl 3 M, Imidazol 30 mM, pH 7.5). En seguida se añadieron 10 mL de la solución amortiguadora E_{PU} (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 1 M, GuHCl 3 M, pH 7.5). Finalmente, cuando la solución E_{PU} estuvo por concluir su paso por el reservorio, se adicionan 30 mL de la solución amortiguadora F_{PU} (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 0.3 M, GuHCl 3 M, Imidazol 0.3 M, pH 7.5). Simultáneamente se comenzó a cuantificar el volumen muerto (aprox. 10 mL) y se colectó en fracciones de 4 mL el frente de elución.

Se dializaron alícuotas para eliminar el agente desnaturizante de las fracciones obtenidas y se analizaron por SDS-PAGE. Se conservaron las fracciones donde la

cantidad y pureza de la proteína fueron elevadas para juntar y concentrar empleando unidades de filtración Amicon® Ultra-15 Ultracel- 50K con tamaño de corte de 50 kDa. Se realizó un cambio de amortiguador para quitar el imidazol y cambiarlo por amortiguador de replegamiento (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0.15 M, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, CuHCl 5 M, pH 8). La concentración final de proteína se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm, para lo cual se utilizó una curva patrón de albúmina solubilizada en el amortiguador de replegamiento. La concentración de proteína se ajustó a aproximadamente a 1 mg/mL y se almacenó en cuarto frío hasta posterior uso.

5.5 MODIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA sf-GFP-SC

Una de las moléculas para conjugar la VLP, era una construcción que contenía a la spGFP fusionada al dominio SpyCatcher, conteniendo entre ambas un sitio de corte para la proteasa TEV (Cayetano-Cruz *et al.*, 2019). Como en esta investigación propusimos cortar a las VLPs ensabladas con la proteína 307-ST-TEV, era posible que cualquier remanente de TEVp podría eliminar dominios de sf-GFP al conjugar las VLPs con sf-GFP-SC. Para evitar la remoción del dominio de sf-GFP por proteólisis y obtener mediciones de fluorescencia exactas, se hizo una modificación al dominio SpyCatcher eliminando el sitio de corte para la proteasa TEV y parte del puente (linker) que une ambos dominios.

La modificación del segmento SpyCatcher en el extremo 5' de gen de la proteína sf-GFP-SC se realizó mediante 2 PCRs (**Figura 11**). Se utilizaron los tres cebadores (primers) mostrados en la **Tabla 1**. Para obtener el templado sobre el cual se realizaron las reacciones de PCR se realizó la extracción del ADN plasmídico de una colonia de *E. coli* DH5 α , con el gen de interés, mediante el protocolo de purificación de ADN plasmídico (miniprep) citado en el Anexo A.6.

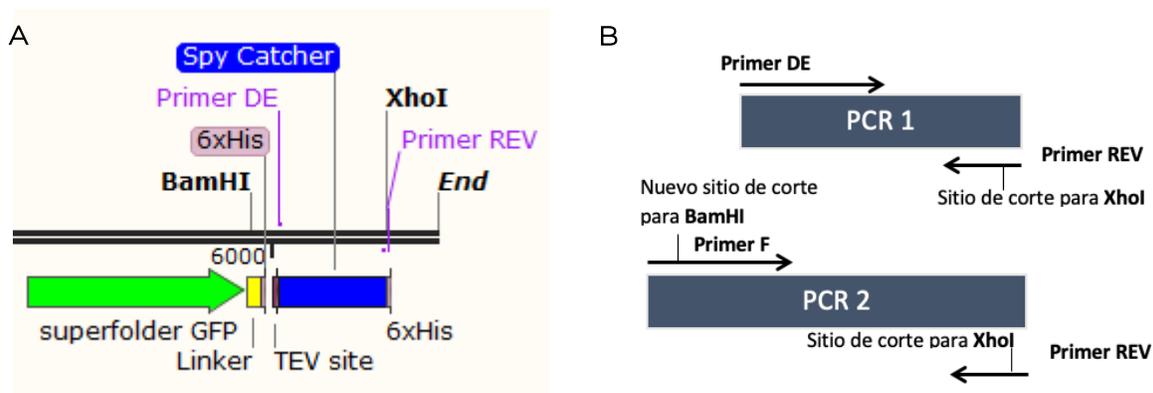


Figura 11. Esquema de la construcción. Panel A: Esquema de la sf-GFP-SC. Finalizando la secuencia de la *sf-GFP* sigue un puente (linker) de Gly y Ser, junto a una etiqueta de histidinas. A continuación, un sitio de corte para la proteasa TEV y finalmente el SpyCatcher. La ubicación de los cebadores para la primera PCR se halla en el segmento del SpyCatcher. Panel B: Esquema de las PCRs, la primera PCR amplifica el segmento SpyCatcher, una segunda PCR sobre el producto de la primera PCR añade un sitio de corte para la enzima de restricción *Bam*HI y re-insertarla en el vector.

Tabla 1. Secuencias de los tres cebadores (dos sentido y uno antisentido) utilizados para realizar las PCRs. Los nucleótidos en negritas conforman los sitios para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I respectivamente.

PCR	Cebador Sentido	Cebador Antisentido
1	5'- GGTGGT GCC ATGGTTGATACC -3' Cebador DE	5'- CGCT CGA GAATATGAGCGTCACCT -3' Cebador REV
2	5'-GGTGGT CTGGTGG ATCCGGCGGT ACCGGTGGT- 3' Cebador F	5'- CGCT CGA GAATATGAGCGTCACCT -3' Cebador REV

La primera reacción de PCR se realizó con el ADN plasmídico del gen de interés para amplificar el segmento que codifica para la región que codifica al dominio SpyCatcher, se utilizaron las cantidades descritas en la **Tabla 2**, ajustando la proporción de reactivos de acuerdo con el volumen deseado. El programa utilizado para el termociclador se describe en la **Tabla 3**.

Con la amplificación obtenida se realizó una segunda PCR en mayor volumen para añadir el sitio de corte para *Bam*HI al inserto, y se utilizó un kit de purificación de PCRs (Jena Bioscience). Posteriormente tanto vector e inserto fueron cortados con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I (New England Biolabs) mediante incubación por 3 h a 37°C, para obtener los extremos cohesivos. Posteriormente

se realizó la purificación del ADN mediante el Kit de extracción por gel de agarosa (Jena Bioscience), de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

Tabla 2. Volumen de reactivos utilizados para llevar a la cabo la PCR.

Reactivo	Concentración
H ₂ O	17.5 µL
10X amortiguador para <i>Taq High Fidelity</i> con MgSO ₄	2.5 µL (200 µM de MgSO ₄)
dNTP mix (10 mM c/u)	1 µL (200 µM de c/u)
Cebador sentido (PCR1)	0.5 µL (0.5 µM)
Cebador antisentido	0.5 µL (0.5 µM)
Templado	0.25 µL
DMSO	2.5 µL
<i>Taq High Fidelity</i> polimerasa	0.25 µL (1.875 unidades)
Volumen final	Volumen final 25 µL

Tabla 3. Temperatura, tiempo y ciclos para llevar a cabo las PCRs.

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	2 min	1x
Desnaturalización	95	20 s	30 x
Alineamiento	56, 58, 60	30 s	
Extensión	68	2 min	
Extensión final	68	10 min	1

Una vez obtenidos vector e inserto purificados, se midió la concentración de ADN en un Nanodrop y se llevó a cabo la reacción de ligación con el vector, a una relación 1:3 y 1:5 (vector/inserto) durante 12 h aproximadamente a de 16°C. Con el producto de la ligación se transformaron células DH5α en un medio LB enriquecido con peptona. Se incubó ON y se analizaron las colonias que crecieron.

5.6 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA NUEVA PROTEÍNA sf-GFP-SC (sf-GFP-SCb)

Para la obtención de células transformantes de *E. coli* BL21(DE3) pLysS, se optó por transformar primero en *E. coli* DH5 α , mediante el protocolo de transformación de células quimiocompetentes, añadiendo cloranfenicol a la placa. Se extrajo el ADN plasmídico y el plásmido que codifica a la proteína verde fluorescente se transformó en la cepa *E. coli* BL21(DE3)pLys a 37°C y 200 rpm en medio Luria Bertani, con 100 μ g/mL de ampicilina en 10 mL de cultivo.

Se centrifugaron las células a 5000 rpm durante 10 min y se lisaron las células con solución de lisis (NaCl 0.1 M, Tris 50 mM, EDTA 2 mM, pH 7.5 y 0.5 mg/mL de lisozima) durante 30 min por 1.5 h a 37°C. Para hacer una prueba rápida y detectar las clonas con el sitio de corte modificado nuevamente se centrifugaron células a 8000 rpm se tomaron 14 μ L y se añadieron 4 μ L de proteasa incubadas por 15 min a 25°C para encontrar las colonias modificadas transformadas con la ligación que no tuvieran el sitio de corte para TEV.

Las colonias modificadas se crecieron de acuerdo con el protocolo para la proteína quimérica 307-ST-TEV, pero disminuyendo el tiempo de incubación ON. Las células cosechadas se lisaron mediante sonicación utilizando pulsos de 9.5 s con 5 s de apagado durante 20 min en un baño de hielo. Para las células lisadas con sf-GFP-SCb, los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 14000 rpm durante 20 min a 4°C, y el sobrenadante se utilizó para la purificación de proteínas mediante cromatografía de afinidad.

La purificación de sf-GFP-SCb se realizó en condiciones no desnaturizantes. El sobrenadante recuperado se cargó a una columna de afinidad HisTrap HP (5 mL) acoplada a un sistema FPLC y equilibrada previamente con Amortiguador PBS (NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KCl 2.7 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH 7.4). La columna se lavó con cinco volúmenes de columna de amortiguador PBS y tres volúmenes de columna de amortiguador PBS con imidazol 35 mM. La proteína unida se eluyó de la columna con amortiguador PBS con imidazol 350 mM y se recogieron fracciones de 2.0 mL. Las fracciones de proteínas se analizaron mediante SDS-PAGE. Debido a las múltiples impurezas obtenidas al concentrar la proteína se

realizó una segunda etapa de purificación utilizando la columna HiTrap Q (HP). Se usó Amortiguador A para cargar la columna (K_2HPO_4 50 mM, NaCl 50 mM, pH 7.5) y el amortiguador de elución B (K_2HPO_4 50 mM, NaCl 500 mM, pH 7.5), para despegar la proteína. Las fracciones ubicadas bajo el pico del cromatograma fueron colectadas y analizadas por SDS-PAGE para verificar la pureza, después se cuantificó la concentración de proteína mediante ensayo de BCA y se guardó con un amortiguador de fosfatos pH 7.4 a una proporción 1:1 con glicerol estéril para filtrarse por $0.45\ \mu m$ y conservarse a $-20^\circ C$.

5.7 ENSAMBLE *IN VITRO* DE 307-ST-TEV

El proceso de replegamiento y autoensamble de las VLPs de la proteína quimérica 307-ST-TEV, se llevó a cabo dializando 1.5 mL de proteína (1.05 mg) en 350 mL de amortiguador PBS Arg ($NaCl$ 137 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 2 mM, L-Arg 200 mM, pH 7.4), y en un volumen igual de amortiguador PBS 2x Arg ($NaCl$ 274 mM, KCl 5.4 mM, Na_2HPO_4 20 mM, KH_2PO_4 4 mM, L-Arg 0.2 M, pH 7.4), ambos en agitación constante a $4^\circ C$, con la finalidad de evaluar la fuerza iónica en el tamaño de nuestra quimera. Es recomendable cambiar el amortiguador en poco volumen cada 12 h para un mejor resultado. Así mismo, se evaluaron tiempos de diálisis desde 40 hasta 60 h, observando el radio hidrodinámico de nuestras partículas, esperando que sea similar al de la VP2 con el asa silvestre.

Entre las diversas moléculas pequeñas para ayudar al replegamiento de proteínas recombinantes a partir de cuerpos de inclusión, la arginina es uno de los aditivos más utilizados y eficaces. Puede formar tanto puentes de hidrógeno como formar interacciones electrostáticas con residuos cargados, debido a que, a pH neutro, la arginina tiene dos cargas positivas por la desprotonación de sus grupos guanidino y amino, mientras que a pH 10 tiene sólo la carga positiva del grupo guanidino. Este último, es responsable de la unión a las proteínas ya que favorece significativamente la interacción con residuos aromáticos y cargados debido interacciones catión- π . Este efecto está relacionado con la supresión de la agregación de las proteínas debido a la interacción entre el grupo guanidinio de la arginina y los triptófanos de las proteínas. El grupo guanidino también

interactúa directamente con la columna vertebral de la proteína, y los grupos metileno de la arginina pueden asociarse con los parches hidrofóbicos de la proteína a través de interacciones de tipo dispersivo e hidrofóbico (Kamerzell *et al.*, 2011)

Sánchez-Rodríguez (2016) empleó a la arginina para facilitar el replegamiento y evitar la agregación de las proteínas, logrando incrementar el rendimiento de VLPs solubles, confiriéndoles mayor estabilidad coloidal.

5.8 PROTEÓLISIS DE VLPS

La proteasa TEV es una proteasa codificada por el virus del mosaico del tabaco (TEV) de aproximadamente ~26 kDa. Dada la especificidad de esta proteasa, es un reactivo muy útil para escindir proteínas con la secuencia canónica de corte. Se hizo la proteólisis de VLPs ensambladas, para investigar si ocurría la proteólisis en la secuencia blanco y el tiempo necesario para que tal reacción llegue a su fin.

Los pasos seguidos para la obtención de la TEVp se pueden consultar en el Anexo A.7.

Se incubaron VLPs con la proteasa a una relación molar 1:10 (VLPs:TEVp) a 4°C, a diferentes tiempos, 0, 2, 4, y 6 h, y un ON con un refuerzo de proteasa (1:5 molar). Se detuvo la hidrólisis añadiendo azul de Coomassie y calentando a las muestras en baño María por 10 min. Otro experimento realizado para conocer si la concentración de proteasa es suficiente o existe algún impedimento estérico, se incubaron VLPs con relaciones molares crecientes de la proteasa (1:10, 1:5, 1:2.5, 1:1) ON a 4°C.

5.9 CARACTERIZACIÓN DE VLPS MEDIANTE DLS

La dispersión dinámica de luz (DLS por sus siglas en inglés), también conocida como espectroscopía de correlación de fotones, mide el movimiento browniano y lo relaciona con el tamaño de las partículas. La relación entre el tamaño de una partícula y su velocidad debido al movimiento browniano se define en la ecuación de Stokes-Einstein. Se iluminan las partículas con un láser y se analizan las

fluctuaciones de intensidad en la luz dispersada en intervalos de tiempo muy cortos para determinar la distribución del tamaño de partícula de la población. Tres tipos de muestras fueron dializadas para ensamblarse: 307-ST-TEV y 307-ST-TEV proteolizada con TEVp a 4 °C ON (ver abreviatura) durante la noche sin agitación. Como control se midieron VLPs ensambladas con VP2.

Las muestras fueron microfiltradas por un filtro de difluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0.45 μm de tamaño poro, y luego por uno de 0.22 μm de tamaño de poro. Las mediciones por DLS se llevaron a cabo usando el equipo Zetasizer μV (Malvern) equipado con un láser de fotodiodo (830 nm). Los parámetros para el análisis fueron fijados en 1.33 para el índice de refracción, 1.003 cP para la viscosidad y 20°C para la temperatura. Se utilizó una celda de vidrio con capacidad para un volumen de 500 μL . Es recomendable hacer 10 corridas con 10 medidas de 10 segundos cada una. Se efectúan las mediciones para determinar la presencia de partículas ensambladas o de sus intermediarios, es decir cápsides íntegramente formadas o en su defecto capsómeros.

5.10 PURIFICACIÓN DE VLPS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

Es la técnica más simple y sencilla de todas las técnicas de cromatografía, separa las moléculas según las diferencias de tamaño a medida que pasan a través de un medio de filtración en gel hecho de un polímero entrecruzado, con un tamaño de poro definido y empaquetado en una columna. A diferencia de la cromatografía de intercambio iónico o de afinidad, las moléculas no se unen al medio de cromatografía, por lo que la composición del tampón no afecta directamente la resolución (el grado de separación entre picos). En consecuencia, una ventaja significativa de la filtración en gel es que las condiciones se pueden variar para adaptarse al tipo de muestra o los requisitos de purificación, análisis o almacenamiento adicionales sin alterar la purificación.

Para la separación y purificación de las distintas especies presentes en las muestras ensambladas se utilizó un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de la marca Waters (2487 dual λ Absorbance detector, 600S

Controller) utilizando la columna Sephacryl S-500 HR como fase fija, y la solución amortiguadora PBS 2x Arg como fase móvil. Se fijó el flujo en 0.5 mL/min y se utilizó un detector UV-Vis ajustado a una longitud de onda de 280 nm para dar seguimiento al progreso de la purificación. A partir del minuto 50 se inició la colección de las muestras en fracciones de 2.0 mL, posteriormente cada una de estas muestras fue analizada mediante DLS para detectar la presencia de VLPs y confirmar el aislamiento de estas. Se analizaron las siguientes especies por este método:

1) VLPs de 307-ST-TEV,

2) VLPs de 307-ST-TEV proteolizadas,

Posteriormente se pasaron por exclusión las especies anteriormente mencionadas pero conjugadas sf-GFP-SCb

3) VLPs de 307-ST-TEV + sf-GFP-SCb

4) VLPs de 307-ST-TEV proteolizadas + sf-GFP-SCb

5.11 FORMACIÓN DEL COMPLEJO sf-GFP-SCb: 307-ST-TEV Y FLUORESCENCIA DE VLPs

La reacción de conjugación de sf-GFP-SCb y 307-ST-TEV se hizo para las VLPs formadas por 307-ST-TEV y una segunda ocasión, pero con VLPs proteolizadas con TEVp a 4 °C ON sin agitación. La formación del complejo se realizó mezclando 2.1 mg de 307-ST-TEV con 2.58 mg de sf-GFP-SCb (relación molar 1: 1.8) en solución amortiguadora PBS 2X con L-Arg a 0.2 M, pH 7.4. Se incubó en un Thermomixer (Eppendorf) a 25°C, a 400 rpm, durante 3 h.

Después de la reacción de SpyCatcher/SpyTag, las VLPs ensambladas y decoradas se separaron de los intermediarios mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). El producto de la reacción de conjugación se microfiltró a través de una membrana de 0.45 µm y se cargó en una columna Superdex 200 grado preparativo, equilibrada con PBS que contenía L-Arg 0.2 M, pH 7,4. Se fijó el flujo a 1 mL/min y se leyó la recolección de proteínas a 280 nm. Se recogieron fracciones de 2 mL entre el máximo del pico cromatográfico y se analizaron mediante DLS.

Para la fluorescencia de las VLPs se realizó una curva de calibración con distintas concentraciones de la proteína sf-GFP-SCb (1- 125 µg) para estimar el número de estas moléculas acopladas a las partículas obtenidas por SEC. La fluorescencia de las partículas se midió a 20°C. Los espectros de emisión de fluorescencia se registraron desde 490 a 600 nm utilizando una longitud de onda de excitación de 485 nm y con ranuras de excitación y emisión de 0.5 mm.

Posteriormente se calculó la concentración de sf-GFP acoplada a las VLPs formadas con la proteína 307-ST-TEV y la misma VLP proteolizada con TEV posterior a su ensamblaje. Se midió por triplicado la fluorescencia de las partículas decoradas, se interpolaron en la curva de calibración, y de acuerdo con la concentración de proteína, se calculó el número de partículas SC-GFP acopladas a las dos especies de VLPs.

Finalmente, para las fracciones del pico principal del cromatograma con el tamaño esperado, se realizó un SDS-PAGE de la muestra para visualizar la interacción de la proteína 307-ST-TEV con la SC-GFP.

5.12 CARACTERIZACIÓN POR MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA

La microscopía de sonda de rastreo o fuerza atómica no ocupa lentes, fotones o electrones. Este tipo de microscopía examina las estructuras de las superficies de las muestras mediante un barrido con una sonda en forma de punta de tamaño nanométrico. En este proceso de barrido las interacciones entre las superficies y la punta son monitoreadas, teniendo como resultado la conformación de imágenes tridimensionales en las que se registran con gran precisión los relieves topográficos de las superficies de las muestras. Dos formas principales de esta tecnología son la microscopía de efecto túnel desarrollada por Binnig y Rohrer de la IBM en Suiza en 1981 (premios Nobel de Física en 1986) y la microscopía de fuerza atómica por Binnig y colaboradores en 1986.

Esta última se puede realizar con varios tipos de muestras, incluso aquellas de material no conductor o aislante. La punta de barrido, de unos nanómetros de

diámetro, está localizada al final de una barra o cantiléver de un poco más de un centenar de micras de largo. La punta barre la superficie de la muestra de diferentes modos o formas de acercamiento o de contacto intermitente o no, detectando, con diversos grados de precisión, la topografía del material en cuestión.

Para el análisis AFM de partículas, se ocuparon las fracciones previamente purificadas por exclusión molecular de 307-ST-TEV y 307-ST-TEV con tratamiento (proteasa ON a 4°C, sin agitación y a una relación molar 1:10 de VLPs contra proteasa); diluidas ($1:1 \times 10^{-9}$) con PBS2X Arg filtrado por una membrana de 0.22 μm . Se dispersaron 15 μL de muestra en la superficie de un disco de mica VI de 12 mm de diámetro (Ted Pella Inc.). Las muestras se secaron al vacío a 75 Torr a temperatura ambiente y luego se lavaron dos veces con 1 mL de agua desionizada para eliminar los cristales de sales tampón, y se secaron al vacío nuevamente.

Los discos de mica se montaron en un disco magnético y se analizaron en el aire utilizando el modo de *tapping* (golpeteo) con un microscopio de sonda de barrido Innova (Veeco Instruments Inc.), equipado con una sonda de barrido de alta resolución Hi-RES-C19 / Cr-Au (MikroMasch). Las sondas tienen un radio de punta <1 nm, con constantes de fuerza promedio de 0.5 N/m, y una frecuencia media de resonancia de 65 kHz, compatible con materiales blandos como proteínas.

5.13 CARACTERIZACIÓN POR CENTRIFUGACIÓN ISOPÍCNICA

La centrifugación isopícnica separa las partículas en un gradiente de densidades en función de la densidad de las mismas, el gradiente es autoformado ya que la muestra se mezcla con la solución del gradiente y conforme se lleva a cabo la centrifugación se genera el gradiente, se aplican velocidades de ultracentrifugación para provocar la separación. Las partículas de la muestra se mueven en el gradiente hasta que llegan a un punto donde la densidad de éstas iguala al gradiente.

El principio de separación no radica en la velocidad de sedimentación sino la densidad de la partícula, que quedará separada del resto en una banda que

agrupa las partículas de igual densidad. Cuando se centrifuga la disolución, la sal de cesio (con gran masa, muy soluble en agua, higroscópica) se redistribuye y alcanza un equilibrio, formando, un gradiente de concentración. La anchura de la banda está determinada por el equilibrio entre la fuerza centrífuga (que tiende a estrechar la banda), la difusión (que tiende a ensancharla) y el gradiente de densidad (un gradiente más pronunciado dará una banda más estrecha).

Muestras de 307-ST-TEV, 307-ST-TEV proteolizada y coensambles con VP2 nativa en diferentes proporciones también se analizaron por centrifugación isopícnica en gradientes continuos de CsCl (1.33 g/mL), esto de acuerdo con lo reportado en la literatura (Kajigaya *et al.*, 1989) donde la cápside proteica sedimentó con la densidad esperada de las cápsides vacías de parvovirus, 1.31 g/ml y 1.42 g/ml para virus intactos. Las instrucciones para preparar esta solución se enlistan en el Anexo A.8. Los ensambles de las VLPs se realizaron en amortiguador PBS 2xArg. La ultracentrifugación se llevó a cabo en una ultracentrífuga Beckman Optima XL90 usando un rotor SW 60 Ti a 55,000 rpm a 20°C durante 10.75 h. Las bandas generadas por efecto de la formación del gradiente fueron recuperadas y sometidas a un proceso de diálisis previa a la caracterización, para realizar un SDS-PAGE y analizar por densitometría los geles resultantes.

5.14 ESTABILIDAD DE 307-ST-TEV

Muestras de proteína 307-ST-TEV y 307-ST-TEV proteolizada (ON a 4°C, sin agitación y a una relación molar 1:5 de VLPs contra proteasa), fueron purificadas a través de exclusión molecular y se midió la concentración de proteína. Se estudió el efecto de un agente caotrópico en la estabilidad de las partículas, para lo cual se colocaron a diferentes concentraciones iniciales de GuHCl (1, 2, 3, 4, 5, y 6 M). Se utilizó el amortiguador de replegamiento con alta molaridad de GuHCl para alcanzar la concentración deseada; la molaridad exacta se calculó de acuerdo con su índice de refracción (<http://sosnick.uchicago.edu/gdmcl.html>). Los cálculos de dilución se realizaron de acuerdo al volumen de celda (0.6 mL), molaridad deseada y concentración de VLPs, se midió el radio hidrodinámico por DLS, el tiempo asignado para llegar al equilibrio fue de 24 h.

6. RESULTADOS

6.1 EXPRESIÓN, LIMPIEZA DE CUERPOS DE INCLUSIÓN Y PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS VP2 Y 307-ST-TEV

Se tiene el gen que contiene al SpyTag fusionado en el asa 301-313 de la proteína VP2. Este gen está subclonado entre los sitios de restricción *XhoI* y *NdeI* del vector de expresión pET22b(+) (Figura 12). Esta proteína tiene el sitio de corte para la TEVp del lado carboxilo del péptido. A partir del residuo 307 del asa comienza el espaciador seguido del SpyTag, además se añadió a la proteína recombinante una etiqueta de 6xHis en el carboxilo terminal para facilitar la posterior purificación (Figura 13), nos referiremos a esta proteína como 307-ST-TEV.

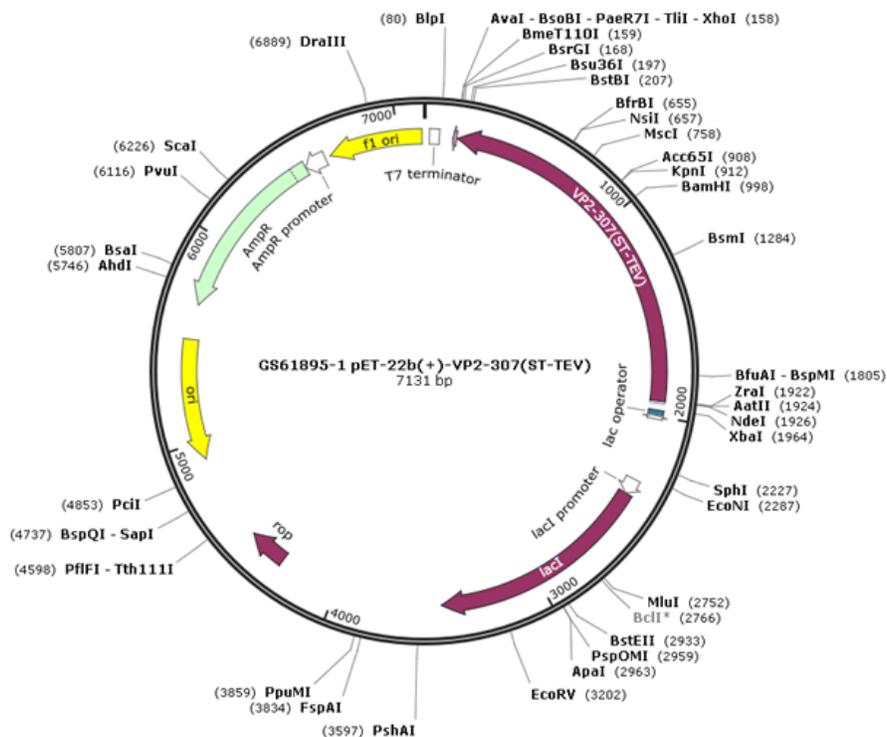


Figura 12. Mapa del plásmido para la expresión de la proteína VP2 307-ST-TEV.

MTSVNSAEASTGAGGGGSNPVKSMWSEGATFSANSVTCTFSRQFLIPYDPEHHYKVFSPAAS
 SCHNASGKEAKVCTISPIMGYSTPWRYLDFNALNLFFSPLEFQHLENIYGSIAPDALTVTISEIA
 VKDVTDKTGGGVQVTDSTTGRLCMLVDHEYKYPYVLQGQDTLAPELPIWVYFPPQYAYLTV
 GDVNTQGISGDSKKLASEESAFAVLEHSSFQLLGTGGTATMSYKFPPVPPENLEGCSQHFYE
 MYNPLYGSRLGVPDTLGGDPKFRSLTHEDHAIQPQNFMGPPLVNSVSTKEGDSSTG**GSGG**
AHIVMVDAYKPTKGGSGGENLYFQSGGTGGGAGKALTGLSTGTSQNTRISLRPGPVSQPYHH
 WDTDKYVTGINAISHGQTTYGNAEDKEYQQGVGRFPNEKEQLKRLQGLNMHTYFPNKGTQ
 QYTDQIERPLMVGSVWNRRALHYESQLWSKIPNLDDSFKTQFAALGGWGLHQPPPQIFLKI
 LPQSGPIGGIKSMGITTLVQYAVGIMVTMTFKLGLRKATGRWNPQPGVYPPHAAGHLPYVL
 YDPTATDAKQHHRHGFEKPEELWTAKSrvHPLE**HHHHHH**

Figura 13. Secuencia de aminoácidos que corresponden a la construcción de la proteína 307-ST-TEV. En azul la secuencia que corresponde a la secuencia SpyTag, en color café el espaciador, en morado la secuencia de corte para TEVp; en color negro la secuencia que corresponde a VP2, y en color verde la etiqueta de seis residuos de Histidina.

La expresión se llevó a cabo en *E. coli* BL21(DE3). Para la obtención de la proteína 307-ST-TEV se transformaron células quimiocompetentes por choque térmico con el plásmido de esta construcción. Se probó la sobreexpresión de la proteína quimérica, así como de la proteína VP2 y se detectaron bandas con las masas moleculares esperadas para ambas proteínas (**Figura 14**).

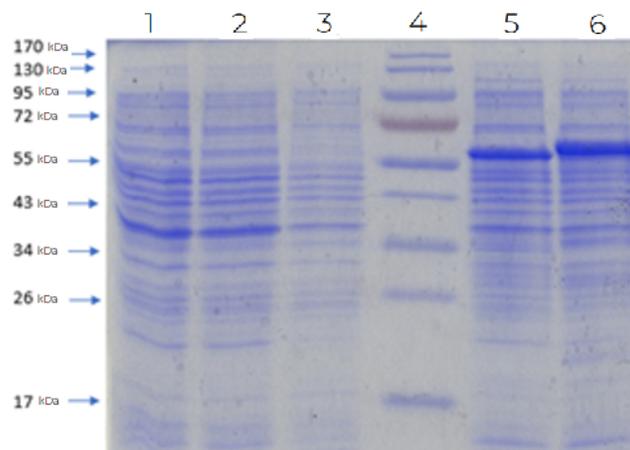
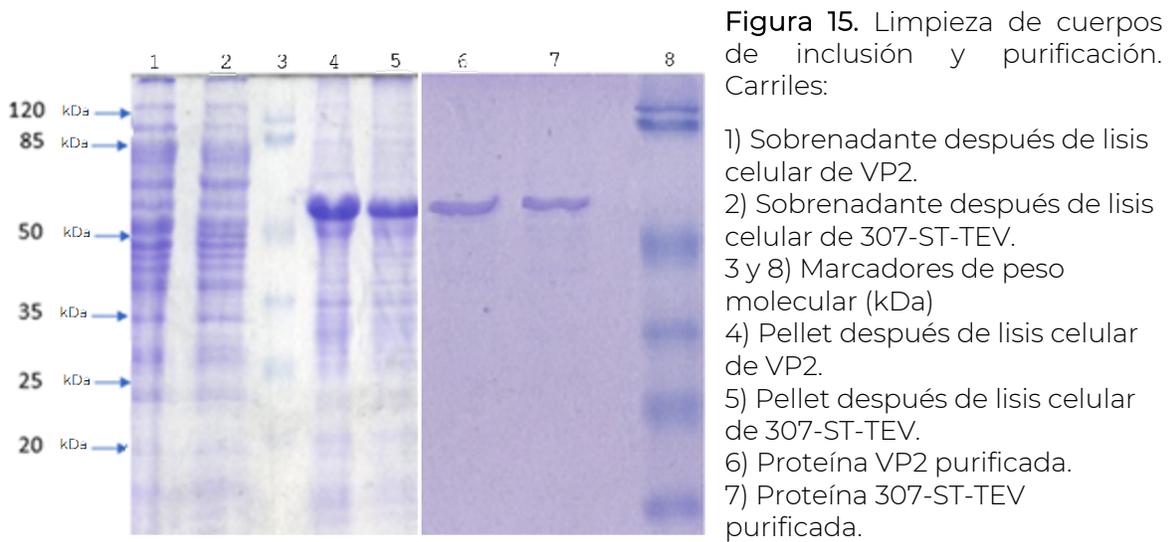


Figura 14. Pruebas de expresión de VP2 y 307-ST-TEV. Carriles 1 y 2: lisado celular antes de la inducción de VP2 y 307-ST-TEV, respectivamente. Carril 4, marcador. Carriles 5 y 6, lisado celular después de la inducción de VP2 y 307-ST-TEV, respectivamente. El peso molecular para la proteína VP2 y 307-ST-TEV es de ~58kDa y ~60 kDa respectivamente.

Posteriormente, las proteínas 307-ST-TEV y VP2 se recuperaron de cuerpos de inclusión, y se purificaron por IMAC bajo condiciones desnaturalizantes (**Figura 15**).



6.2 MODIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA sf-GFP-SC

Para modificar el gen que codifica a la proteína sf-GFP-SC se tuvo que extraer, digerir y purificar el vector de clonación, el cual tiene 6531 pares de bases (**Figura 19**).

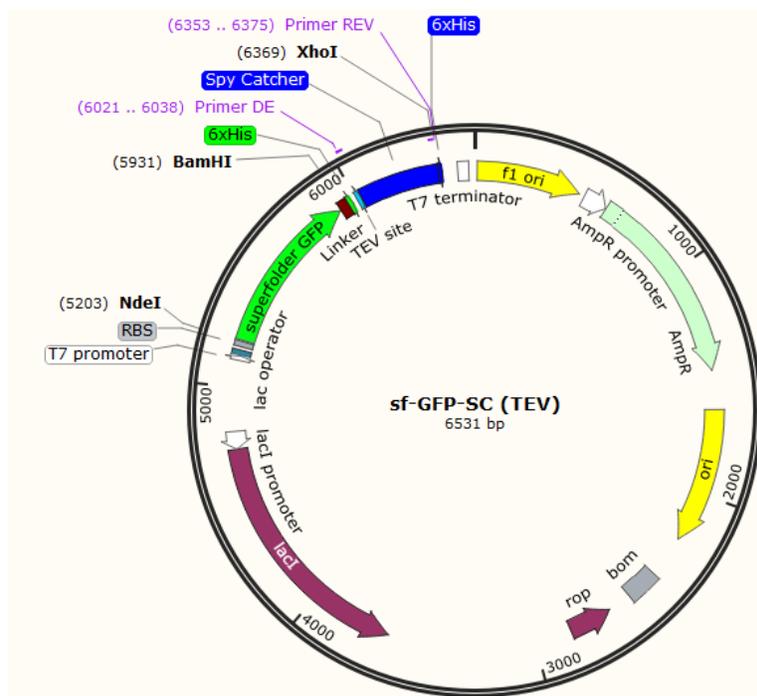


Figura 19. Mapa del plásmido para la expresión de la proteína sf-GFP-SC.

Con el ADN plasmídico se realizó la primera PCR (**Figura 20**). De acuerdo con la T_m de los cebadores (64 °C), se restaron 5 °C y utilizaron 3 temperaturas diferentes alrededor de esta temperatura (59 °C) para asegurar la amplificación.

Con el fin de demostrar que el fragmento esperado de 458 pbs se encontraba en el peso molecular, se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% para comprobar que se hubiera amplificado correctamente el segmento que codifica al SpyCatcher. (**Figura 20**). Este primer producto fue nuevamente sometido a amplificación mediante PCR incluyendo dentro del cebador (Primer F), la secuencia de corte para la enzima de restricción *Bam*HI y posteriormente efectuar la ligación.

Una vez obtenido el producto de la segunda PCR, se realizó una digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I (New England Biolabs) para generar los extremos cohesivos y llevar a cabo su ligación con el vector, en este punto se observó que la doble banda presente en varias PCRs realizadas a distintas temperaturas, desapareció gradualmente dando lugar a una banda mayoritaria.

El resultado del gel muestra bandas con los pesos esperados, tanto del vector (~6531 pbs) como del inserto (~482 pbs). Con el producto de la ligación se transformaron células DH5 α , creciendo 7 colonias que se estudiaron para corroborar la modificación de la secuencia proteica. Finalmente, este nuevo plásmido se envió a secuenciar para constatar la secuencia del gen resultante. A la nueva versión de sf-GFP-SC sin sitio TEV se le denominó sf-GFP-SCb.

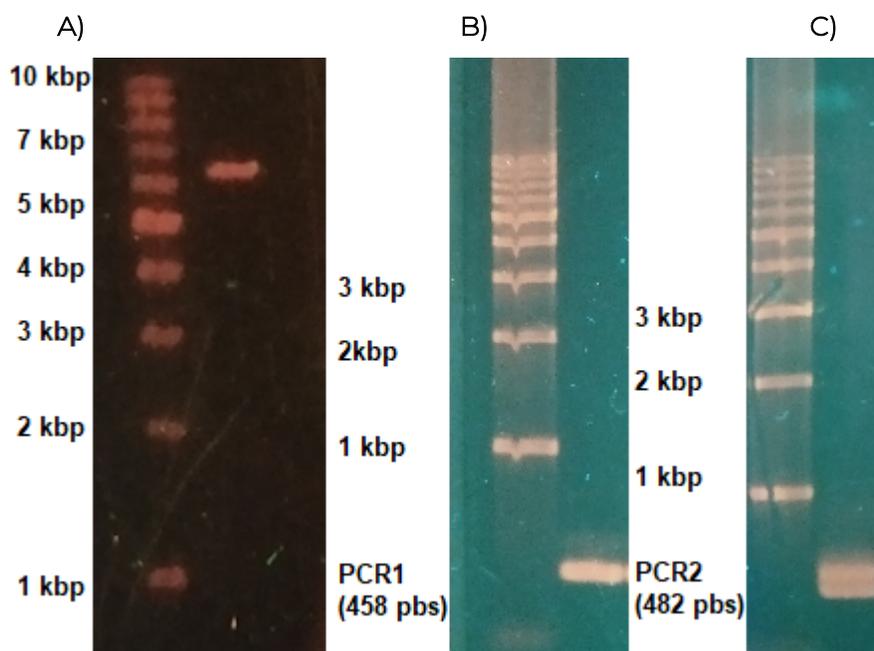


Figura 20. Geles de agarosa mostrando el producto de la digestión y de las PCRs. Panel A: Vector pET sf-GFP-SC linealizado con XhoI. Panel B: Fragmento del producto obtenido del PCR1. Panel C: Fragmentos del producto obtenido del PCR 2.

6.3 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE sf-GFP-SCb

Con el ADN plasmídico extraído se transformaron células competentes de *E. coli* BL21(DE3) pLysS, se crecieron en tubo con 10 mL de medio de cultivo y se efectuó la sobreexpresión para constatar el cambio en la proteína.

Todas las colonias crecidas en tubo mostraron el brillo verde fluorescente característico, y se realizó una prueba rápida para saber qué colonias tenían a la sf-GFP-SCb. El pellet de las colonias se lisó con solución de lisis y nuevamente se centrifugó en tubos Falcon para quitar restos celulares. Se tomó una alícuota del extracto celular y se añadieron 4 μ L de TEV purificada, se incubaron 15 min. a 25 $^{\circ}$ C para observar si existía proteólisis y por ende la modificación del sitio de corte. Los resultados se observan en la **Figura 21**.

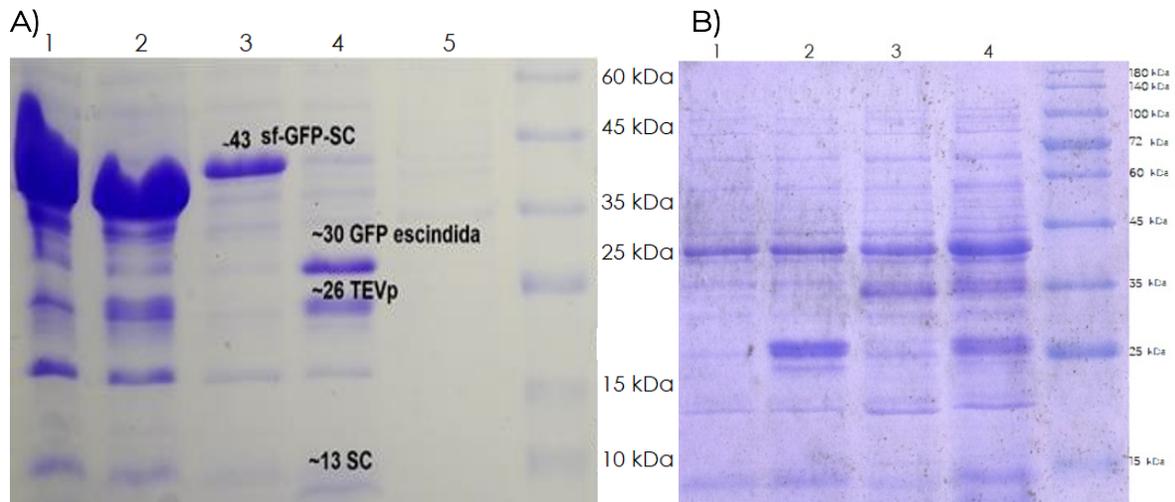


Figura 21. Prueba de modificación al sitio de corte. **Panel A**, carriles 1 y 2: sobreexpresión de diferentes colonias obtenidas de la ligación. Carril 5: extracto celular antes de inducción. Carril 3: sobreexpresión de GFP de una colonia sin modificación. Carril 4: sobreexpresión de GFP de una colonia sin modificación añadiendo proteasa TEV durante 15 min, se observa proteólisis pues la GFP de 43 kDa se escinde a fragmentos teóricos de 30 y 13 kDa. **Panel B**, carriles 1 y 3: sobreexpresión de GFP de colonias modificadas. Carril 2 y 4: sobreexpresión de GFP de colonias modificadas añadiendo proteasa TEV durante 15 min, no ocurre proteólisis.

La colonia con la modificación deseada se escaló usando el mismo protocolo que para la proteína quimérica 307-ST-TEV, pero disminuyendo el tiempo de incubación de 8 a 6 h. La secuencia de la proteína quimérica modificada se encuentra en la **Figura 22**.

```
MRKGEELFTGVVPIVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATNGKLTLLKFICTTGKLPVP
WPTLVTTLTLYGVQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTISFKDDGTYKTRAE
VKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNFNSHNVYITADKQKNGIKANFKIRH
NVEDGVSQVLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSVLSKDPNEKRDHMLLEFV
TAAGITHGMDELYKGGSGSGSGMSYHHHHHDYDIPTTENLYFQGMVDTLS
GLSSEQGQSGDMTIEEDSATHIKFSKRDEDGKELAGATMELRDSSGKTISTWISDGG
VKDFLYLPKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVNGKATKGDHILEHHH
HHH
```

Figura 22. Secuencia de aminoácidos de la proteína sf-GFP-SCb. En negro la secuencia que corresponde a la sf-GFP, en color café el espaciador, resaltado en gris se halla la parte de la secuencia eliminada, en morado la secuencia de corte para TEVp, en color verde la etiqueta 6xHis.

La purificación de la proteína se realizó por IMAC y las fracciones de elución se analizaron mediante SDS-PAGE (Figura 23). El peso molecular teórico de la proteína es de ~40 kDa, de acuerdo con el servidor ProtParam. Al concentrarse las fracciones de interés se observó que la pureza de la proteína no era la idónea para trabajar, por lo que se volvió a purificar, esta vez por una columna de intercambio aniónico acoplada al FPLC (Figura 24).

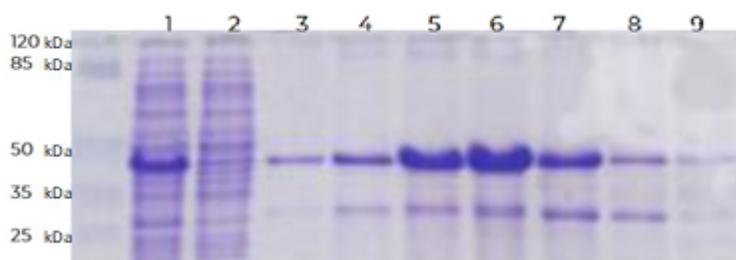


Figura 23. Purificación de sf-GFP-SCb por cromatografía de afinidad. Carril 1: Sobreexpresión de sf-GFP-SCb. Carril 2: extracto celular antes de inducción. Carril 3-9: Fracciones de interés con impurezas.

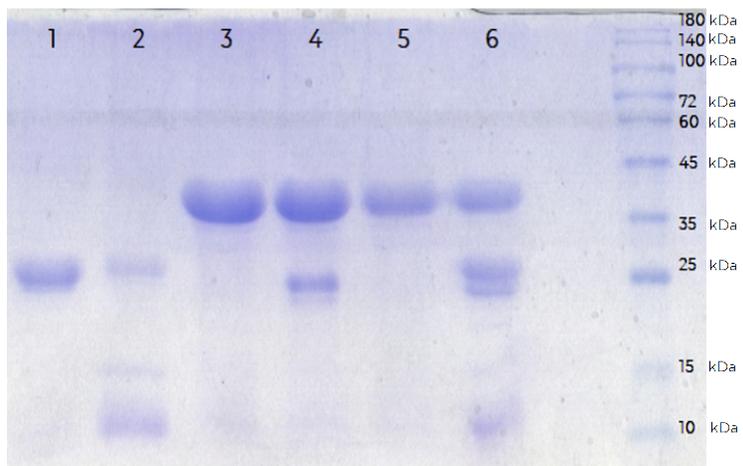


Figura 24. Purificación de sf-GFP-SCb por cromatografía de intercambio aniónico.

Carriles 1 y 2: proteínas contaminantes.

Carriles 3 y 5: fracciones correspondientes a sf-GFP-SCb (40 kDa).

Carril 4: sf-GFP-SCb (40 kDa) + TEVp (26 kDa).

Carril 6: sf-GFP-SC (40 kDa) antes de 2^{da} purificación.

6.4 ENSAMBLE *IN VITRO* DE 307-ST-TEV Y CARACTERIZACIÓN POR DLS.

La proteína purificada 307-ST-TEV se usó para pruebas *in vitro*. Trabajos previos mencionan que, dependiendo de condiciones como fuerza iónica, pH y temperatura, es posible obtener una variedad de especies de ensamblado y es limitada por las características estructurales intrínsecas de las proteínas.

Anteriormente se había observado que en el amortiguador PBS Arg, esta proteína generaba partículas de menor tamaño al esperado para una VLP. Por ello se decidió probar una mayor fuerza iónica durante el ensamble.

La fuerza iónica parece ser determinante en el acomodo de cada monómero de proteína. De modo que una concentración muy baja o alta de sal podría provocar que los capsómeros (trímeros) no puedan interaccionar de manera adecuada con otros trímeros para completar un icosaedro y no se logren estabilizar estas especies para cerrar por completo la cápside.

Se utilizó L-Arg en el amortiguador ya que tiene cierta afinidad específica, aunque débil, por las cadenas laterales aromáticas, que se encuentren enterradas en la proteína plegada, responsables de la agregación de estructuras proteicas desplegadas o parcialmente plegadas. Esta interacción es capaz de ayudar a suprimir la agregación debido a que el grupo guanidino de la arginina interactúa con los electrones π de las cadenas laterales aromáticas.

El tiempo de diálisis es un factor para considerar, pues se tiene registro del caso de una VLP ensamblada únicamente con una quimera de VP2 con una lipasa insertada igualmente en el asa 301-313, donde la incubación de hasta 60 h favoreció que el diámetro de las partículas polidispersas de 10 nm aumentara de a 28 nm en una población monodispersa (Bustos-Jaimes *et al.*,2017).

Para este fin, las VLPs se ensamblaron por diálisis al equilibrio para eliminar el GuHCl usando dos amortiguadores de distinta fuerza iónica: PBS-Arg (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 10 mM, 0.2 M L-Arg, pH 7.4) y PBS-2xArg (NaCl 274 mM, KCl 5.4 mM, Na₂HPO₄ 20 mM, KH₂PO₄ 4 mM, L-Arg 0.2 M, pH 7.4). A partir de las 40 h de diálisis, se midió el radio hidrodinámico de la muestra cada 2 h (40, 42, 44, 46, 48 y 60 h). Las mediciones por DLS se muestran en la **Tabla 4**.

Para el amortiguador PBS-Arg se dejó de medir a las 46 h puesto que empezaron a coexistir dos poblaciones, algunas con tamaños de VLP y otra de intermediarios de menor tamaño similar a capsómeros (no mostrados en la tabla). En cambio, en el amortiguador PBS-2xArg, la población mayoritaria se mantiene y alcanza la mayoría de población (99.5%) a las 42 h, con un pico monodisperso de

aproximadamente 21.3 ± 6.5 . (Figura 25). Incluso la solución PBS-Arg también alcanza a las 42 h una población mayoritaria dentro de los tamaños, lo que sugiere que es el tiempo adecuado para dializar la VLP de la quimera.

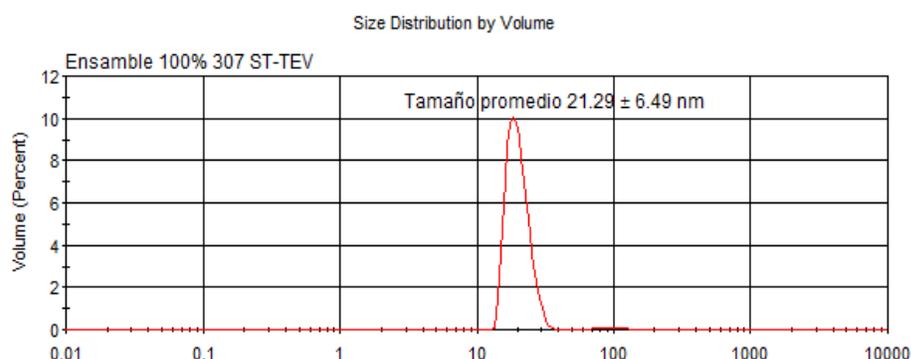


Figura 25: Diagrama de dispersión por volumen para el ensamble después de dializar 42 h a 4°C contra PBS-2xArg.

Los radios hidrodinámicos se hallan en concordancia a lo reportado en nuestro grupo de trabajo (Cayetano-Cruz *et al.*, 2018, 2019; Bustos-Jaimes *et al.*, 2017; Morán-García *et al.*, 2016; Santillán-Uribe *et al.*, 2015; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012) aunque se esperaba un ligero aumento del radio hidrodinámico debido a que el SpyTag estaría alargando el asa 301-313.

Tabla 4. Comparación del diámetro de VLPs ensambladas en diferentes amortiguadores, medidos por DLS.

PBS-Arg				PBS-2xArg			
Tiempo (h)	Tamaño (d. nm)	% Volumen	St-Dev	Tiempo (h)	Tamaño (d. nm)	% Volumen	St-Dev
40	25.0	70.2	6.1	40	21.2	99.3	6.3
42	20.7	91.9	5.7	42	21.3	99.5	6.5
44	21.2	80.1	5.0	44	20.7	99.3	6.0
46	25.8	43.5	6.5	46	20.5	95.2	4.9
*	*	*	*	48	19.3	96.8	4.8
*	*	*	*	60	22.3	98.9	5.2

6.5 PROTEÓLISIS DE VLPs

En el primer experimento se colocaron 120 µg de VLPs y se incubaron ON sin agitación con 5.4 µg de proteasa (10:1 en relación molar), y se muestreó a las 2, 4, 6, 8 h. La reacción se detuvo con azul de Coomassie en baño María. A la última

muestra se le añadió nuevamente 5.4 μg de proteasa (**Figura 26**). El peso molecular observado en el gel para la proteína 307-ST-TEV es de ~ 60 kDa, aunque el calculado por ProtParam es de 65 kDa. Si esta es escindida en la secuencia de corte, se obtienen dos partes que se hallan aproximadamente en los pesos moleculares de 35 kDa y 25 kDa (36 y 29 kDa según ProtParam). Como se aprecia en el gel, al añadir nuevamente la proteasa, se observa disminución en la intensidad de la banda de 307-ST-TEV y el aumento en la intensidad de los segmentos producto de la hidrólisis.

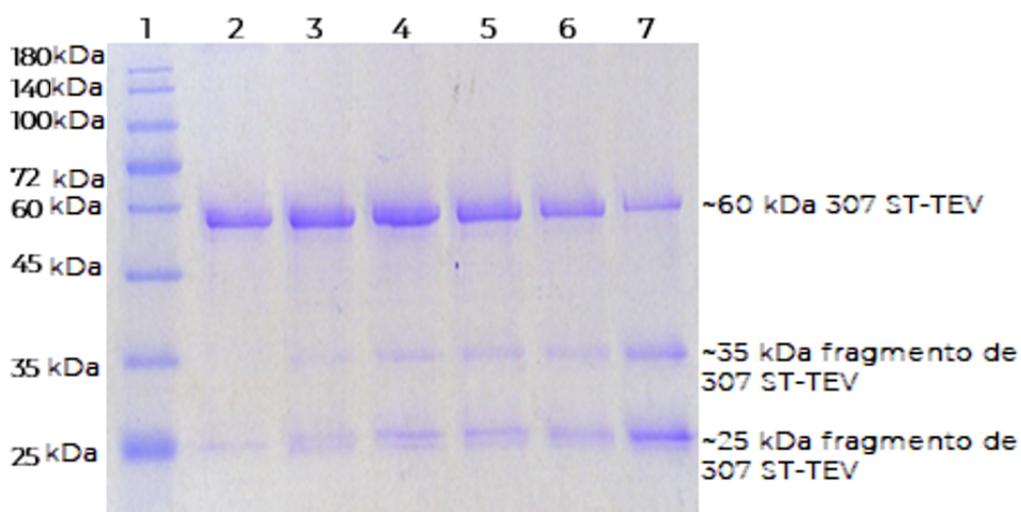


Figura 26. Proteólisis de 307-ST-TEV con TEVp a distintos tiempos, relación 1:10 molar. Carril 1: Marcador de peso molecular (kDa). Carril 2: Tiempo 0, Carril 3: 2 horas, Carril 4: 4 horas, Carril 5: 6 horas, Carril 6: 8 horas, Carril 7: 16 horas, más refuerzo de proteasa (1:5 molar). La hidrólisis se llevó a cabo a 4°C .

En un análisis por densitometría con el programa Image Lab™, se obtuvieron los porcentajes para saber el grado de hidrólisis. A las 2 h, 7.4% de la proteína 307-ST-TEV fue hidrolizada, a las 4 h existe una proteólisis del 12.9 %, a las 6 horas existe una proteólisis del 15.6 %. A las 8 horas el fragmento proteolizado representa el 30.2%, aumentando significativamente el grado de hidrólisis. Finalmente, con el refuerzo ON (1:5) aproximadamente el 65% de la proteína puede ser digerida bajo estas condiciones. Esto sugiere que puede ser necesario añadir más proteasa para

llegar a la máxima hidrólisis posible. Otro fenómeno que se observa es que la hidrólisis no es total, debido a dos posibles factores: un efecto estérico o a la inactivación de la proteasa.

En un segundo experimento (**Figura 27**), se aumentó la relación molar de la proteasa (1:10, 1:5, 1:2.5, y 1:1) dejándose ON sin agitación a 4°C. Se detuvo la reacción mediante la adición de amortiguador de carga y baño María. Se realizó una electroforesis y se analizó el gel con las muestras. La temperatura a la que se realizó la proteólisis fue de 4°C para no comprometer la integridad de las VLPs.

Nuevamente con el análisis del programa Image Lab™ se cuantificaron los porcentajes de hidrólisis. Para la relación 1:10 de proteína con respecto a la proteasa, el grado de hidrólisis fue de 69.6% y para la relación 1:5 fue de 79.2%, aumentando el porcentaje de hidrólisis con respecto del experimento anterior, esto se pudo deber a que se utilizó un nuevo lote de proteasa y a una cuantificación inadecuada de la proteína para el primer experimento.

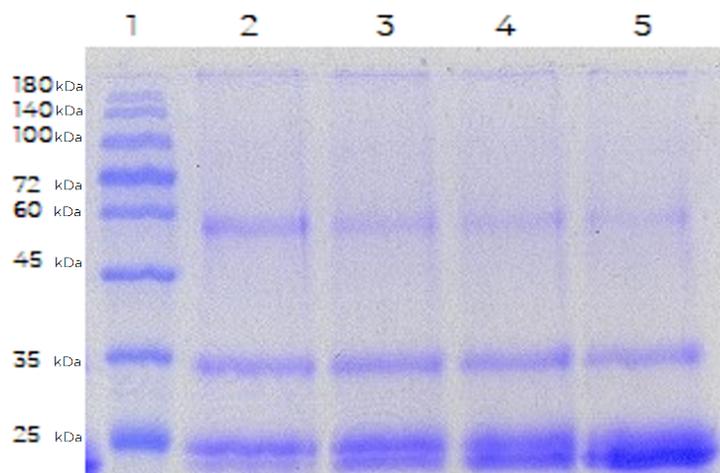


Figura 27. Proteólisis de 307-ST-TEV con TEVp a distintas relaciones molares. Carril 1) Marcador de peso molecular (kDa); carril 2) 307-ST-TEV:TEVp 1:10; carril 3) 307-ST-TEV:TEVp 1:5; carril 4) 307-ST-TEV:TEVp 1:2.5; carril 5) 307-ST-TEV:TEVp 1:1.

Para la relación 1:2.5 el porcentaje de hidrólisis alcanzó el 80.5% y para la relación 1:1 alcanzó obtuvo hidrólisis del 85.2%. Nuevamente se observó que a pesar de los intentos por proteolizar el 100% o en su totalidad la quimera, no se logra. Se teoriza

entonces de que algún impedimento estérico vuelve inaccesible el sitio de corte para que se acople la proteasa en el asa móvil, además aún falta confirmar la integridad de la cápside.

6.6 CARACTERIZACIÓN DE VLPs MEDIANTE DLS

Se analizaron por DLS las muestras de los ensamblajes con el 100% de la proteína quimérica 307-ST-TEV y también las VLPs tratadas (proteasa ON a 4°C, sin agitación y a una relación molar 1:5 de VLPs contra proteasa) para medir el radio hidrodinámico de la población mayoritaria, como control se utilizó la VLP de VP2. Las muestras antes de ser pasadas por SEC, se midieron preliminarmente por DLS para evaluar los tamaños obtenidos y asegurar el ensamblaje de la cápside.

La **Figura 28** muestra las distribuciones por volumen de los dos ensamblajes estudiados, se reporta el valor promedio de las medias de cada distribución y la desviación estándar de estos valores. Para 307-ST-TEV se obtuvo un tamaño de 22.5 ± 5.5 por volumen (**Figura 28 panel B**). Que resulta ser un poco más pequeño que la VLP de VP2, aunque está dentro del error de la técnica. Para la especie proteolizada se observa que también tiene un radio hidrodinámico similar y que es ligeramente mayor que 307-ST-TEV, esto tiene sentido pues se libera el asa más móvil asemejando a una VLP más “esponjosa”. La anchura del pico es proporcional a la polidispersidad, lo que denota la existencia de más de un tamaño en las especies formadas.

Sin embargo, los datos sugieren que las partículas siguen ensambladas a pesar del corte en el asa 301-313. De otro modo, esperaríamos especies de tamaño menor a los 15 nm si se tratara de capsómeros, o menor a los 6 nm si se tratara de monómeros de la quimera. Y lo más importante, esperaríamos especies de tamaños mucho mayores por agregación dado que el corte es prácticamente a la mitad de la proteína, lo cual debería afectar el núcleo hidrofóbico de la partícula generando especies propensas a la agregación. Una debilidad inherente del DLS es su baja resolución. Por ejemplo, el DLS no puede distinguir entre partículas de 90 y 110 nm, apareciendo un pico amplio. Para ofrecer una resolución máxima, el

DLS requiere partículas de tamaño diferente en al menos un factor de 3 (por ejemplo, 10 y 30 nm, 50 y 150 nm. Esta es una limitación del DLS, especialmente para muestras polidispersas (Bhattacharjee *et al.*, 2016). Esto puede explicar porque la medición de las muestras proteolizadas tiene un pico más ancho, ya que pueden no ser estrictamente homogéneas, sinónimo de una muestra mas heterogénea.

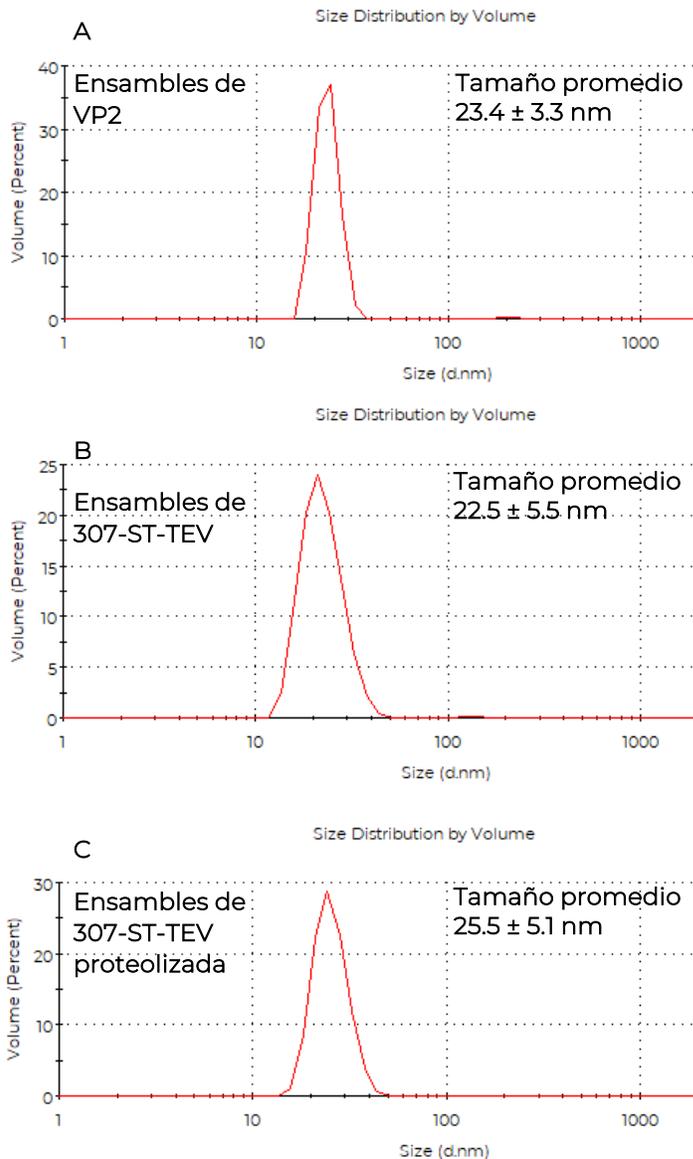


Figura 28. Distribución de tamaño de partícula por DLS.

Panel A: VLPs de VP2 dializada 40 h en PBS Arg 0.2 M, pH 7.4

Panel B: VLPs de 307-ST-TEV dializada 42 h en PBS 2x Arg 0.2 M, pH 7.4.

Panel C: VLPs de 307-ST-TEV dializada 42 h en PBS 2x Arg 0.2 M, pH 7.4 y proteolizada con TEV (1:5) ON a 4 °C.

6.7 PURIFICACIÓN DE VLPS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

Otra de las caracterizaciones realizadas para verificar el correcto ensamble de las VLPs fue la purificación mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC), primero se ensamblaron las partículas en el tiempo idóneo de 42 h, y se separaron capsómeros de las VLPs, comparando entre las distintas especies el tiempo de retención en la columna y corroborando nuevamente el tamaño de la partícula medido mediante DLS. Se comenzó con VP2 como control, seguido de VLPs de 307-ST-TEV y posteriormente se separaron las mismas VLPs de 307-ST-TEV proteolizadas (proteasa ON a 4°C, sin agitación y a una relación molar 1:5 de VLPs contra proteasa) con el fin de observar algún cambio los parámetros mencionados anteriormente.

En la **Figura 29** se muestra el cromatograma para las VLPs de la proteína VP2 como control. El tiempo de retención promedio donde se presenta el máximo de absorbancia fue de ~74 min, idéntico a las VLPs de la quimera 307 ST-TEV con un pico definido, mostrada en la **Figura 30 Panel A**. Se trabajó también con la VLP proteolizada en el asa más móvil, para saber si se desensambla o forma agregados. El tiempo de retención cambió por un par de minutos a aproximadamente ~72 minutos, menor al obtenido por 307-ST-TEV, lo que sugiere la presencia de partículas con un diámetro ligeramente más grande. Sin embargo se aprecia una pequeña protuberancia alrededor del minuto 100 que podría corresponder a la TEVp o quizás a una fracción de proteína desensamblada (**Figura 30 Panel B**). La fracción correspondiente a la protuberancia no fue medida por DLS.

Las fracciones donde se recolectaron los picos de máxima absorbancia se midieron mediante DLS para confirmar el hecho de que el tamaño de partículas es acorde a una VLP y que el tamaño de las partículas proteolizadas es ligeramente mayor a la que no tiene tratamiento (**Figura 31**). Los resultados evidencian que hay un incremento de tamaño para la quimera proteolizada a comparación de la que no tiene tratamiento proteolítico.

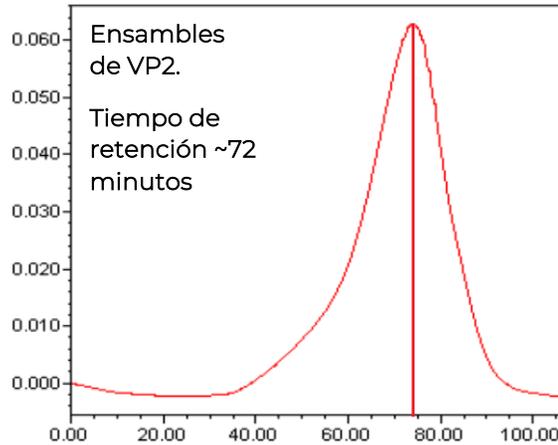


Figura 29. Cromatogramas de filtración en gel para VLPs de VP2. La línea media representa el máximo de absorbancia alrededor a los 74 minutos.

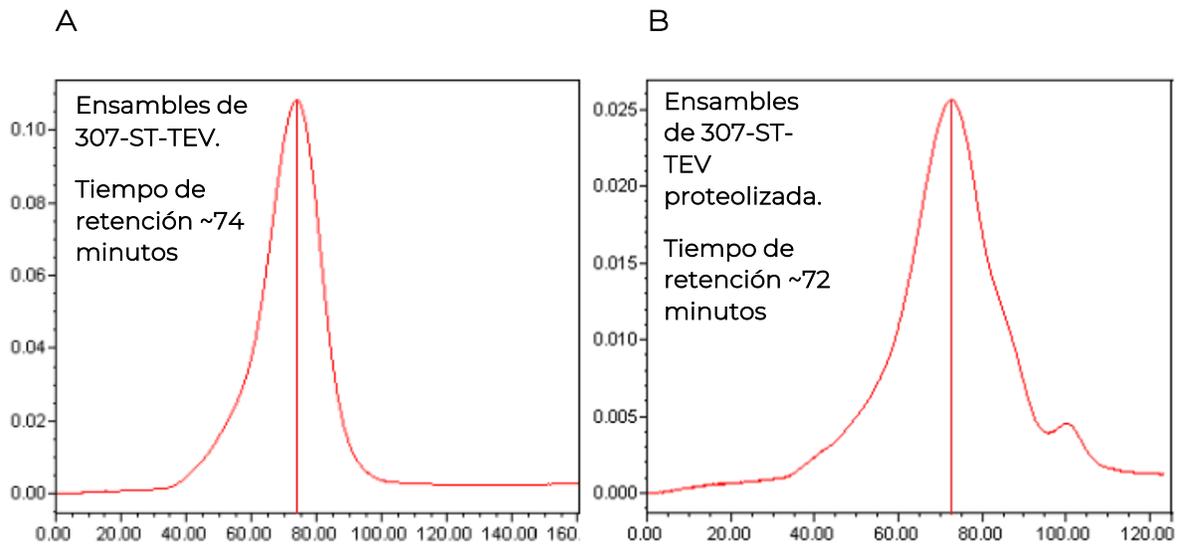


Figura 30. Cromatogramas de filtración en gel para VLPs de 307 ST-TEV. La línea media representa el máximo de absorbancia. Panel A: 307-ST-TEV, Panel B: 307-ST-TEV proteolizada, relación molar 1:5 ON a 4°C, se observa una protuberancia alrededor del minuto 100 que podría corresponder a la TEVp o a una fracción de proteína desensamblada.

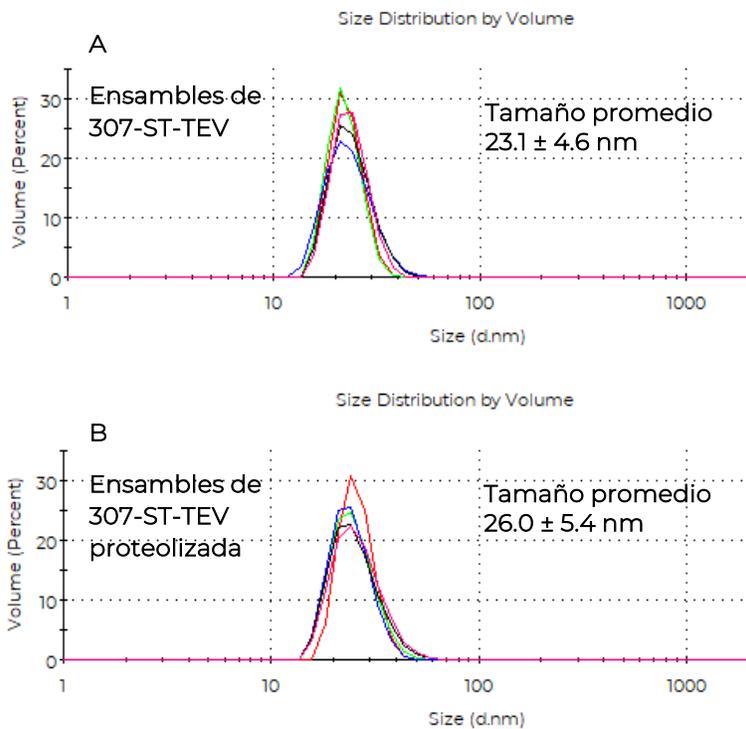


Figura 31. Distribución de tamaño de partícula mediante DLS para la fracción de mayor absorbancia purificada mediante cromatografía de exclusión molecular.

Panel A: VLPs de 307-ST-TEV.

Panel B: VLPs de 307-ST-TEV proteolizada.

6.8 FORMACIÓN DEL COMPLEJO sf-GFP-SCb CON 307-ST-TEV

Los ensamblados de la quimera fueron conjugados con la contraparte sf-GFP-SCb para efectuar la reacción de SpyCatcher/SpyTag. Las VLPs ensambladas y decoradas se separaron de los intermediarios mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Para las VLPs conjugadas con sf-GFP-SCb se utilizó la columna Superdex 200 grado preparativo ya que el tiempo de retención de la sf-GFP-SCb en la columna Sephacryl S-500 HR es de 76 min, muy cercano al tiempo de retención de las VLPs. Por lo que no es capaz de separar las VLPs de la proteína a acoplar (**Figura 32**), además, para poder medir en una curva patrón la fluorescencia de la proteína acoplada, necesitamos quitar todo el remanente de la proteína que no reaccionó. El acoplamiento mediante el sistema SpyCatcher/SpyTag se realizó en las condiciones reportadas por colaboradores del grupo de trabajo (Cayetano *et al.*, 2018).

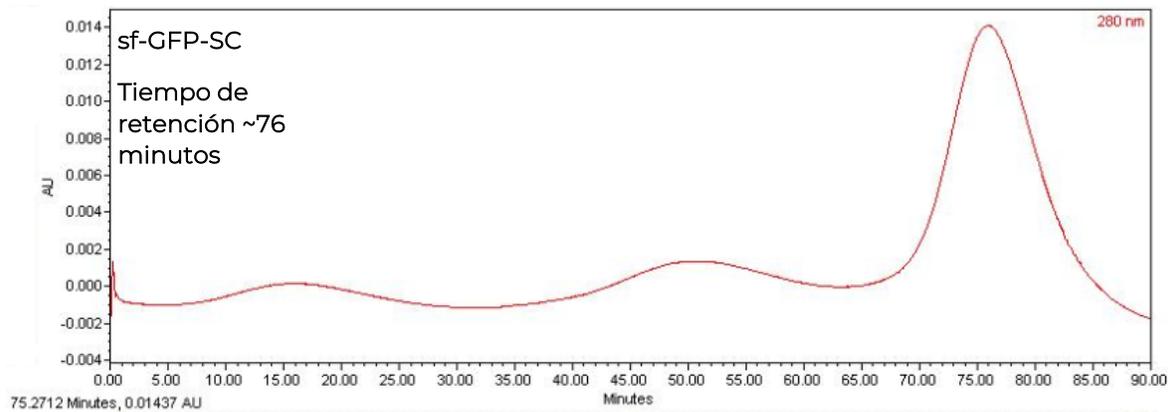


Figura 32. Cromatograma de filtración en gel de sf-GFP-SCb con la columna Sephacryl S-500 HR.

6.8.1 PURIFICACIÓN DE VLPS DECORADAS POR CROMATOGRFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

El producto de la reacción de conjugación se microfiltró a través de una membrana de 0.22 μm . No se determinó la concentración de proteína por BCA antes y después de cada etapa de microfiltración, tampoco se observó precipitación de proteína a simple vista, está reportado que el porcentaje de recuperación de proteína en PBS-Arg 0.2 M y pH 7.4 es del 98% y en este caso se filtró por protocolo de cuidado de la columna (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2016). Después se cargó en una columna Superdex 200 equilibrada con amortiguador PBS-Arg. Se utilizó esta columna puesto que tiene el grado de resolución necesario, separar proteínas con pesos moleculares (M_r) que van de 10 a 600 kDa, para separar toda la proteína sf-GFP-SCb que no reaccionó.

La separación de proteínas se siguió por absorbancia a 280 nm, y se recolectaron fracciones de 2 mL en el pico de máxima absorbancia y se midieron mediante DLS (Figura 33).

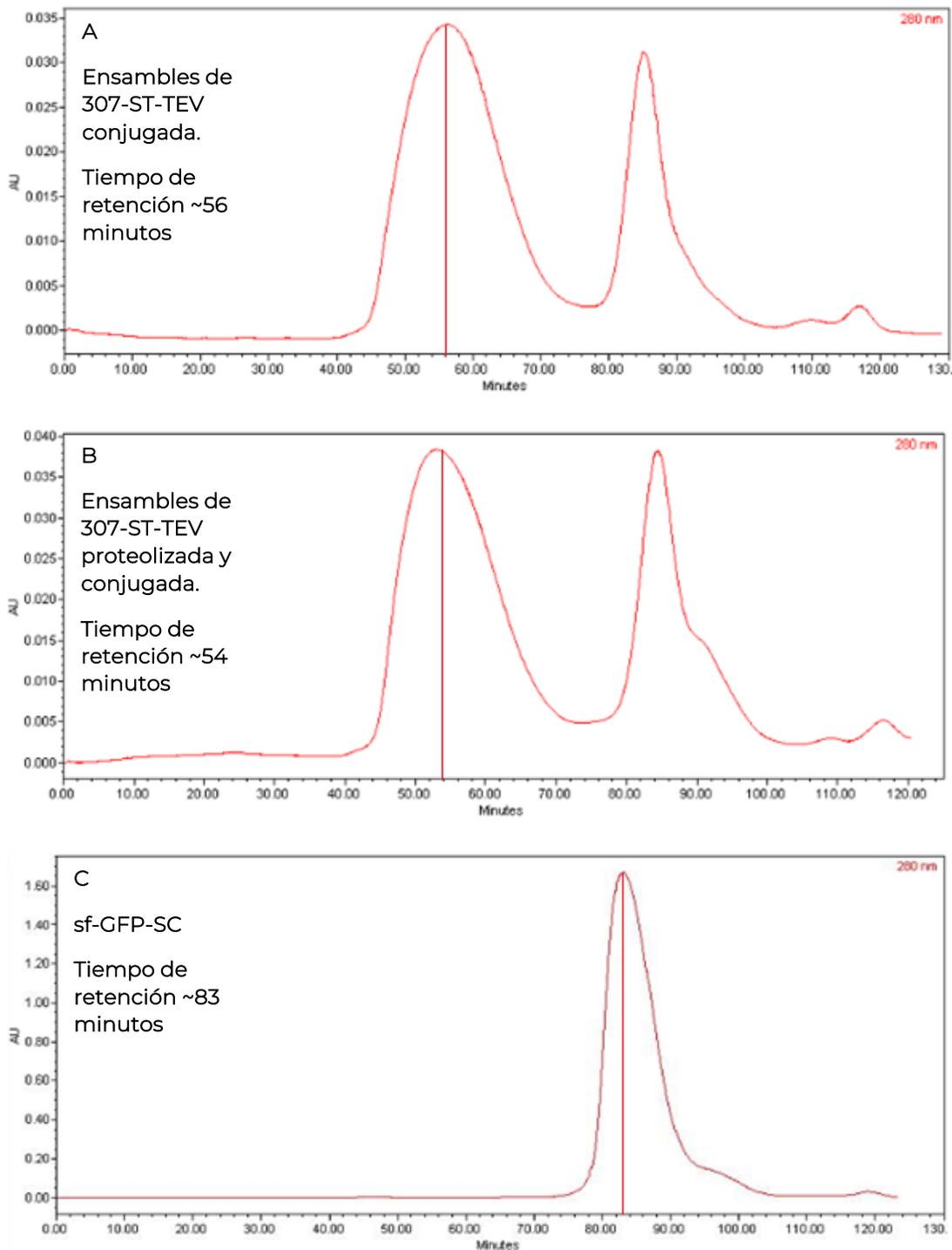


Figura 33. Cromatogramas de filtración en gel con la columna Superdex 200 grado preparativo. Panel A: VLPs de 307-ST-TEV conjugada con sf-GFP-SCb (1:1.8) tiempo de retención 56 minutos. Panel B: VLPs de 307-ST-TEV proteolizada relación molar (1:5) ON a 4°C y posteriormente conjugada con sf-GFP-SCb (1:1.8). Panel C: proteína sf-GFP-SCb.

En la **Figura 34** panel A se muestra el cromatograma para las VLPs de la proteína 307-ST-TEV decorada con la proteína fluorescente. El tiempo de retención promedio donde se presenta el máximo de absorbancia es de ~56 min. En el panel B se muestra el cromatograma de las VLPs proteolizadas (proteasa ON a 4°C, sin agitación y a una relación molar 1:5 de VLPs contra proteasa) y decoradas con la proteína fluorescente, el tiempo de retención cambió a ~54 min, tiempo nuevamente menor al obtenido por 307-ST-TEV, lo que sugiere la presencia de partículas con un diámetro ligeramente más grande. Finalmente, el panel C muestra la elución de la proteína verde fluorescente con un tiempo de retención promedio de 83 minutos. El tiempo de retención para la partícula sin conjugar no fue medido.

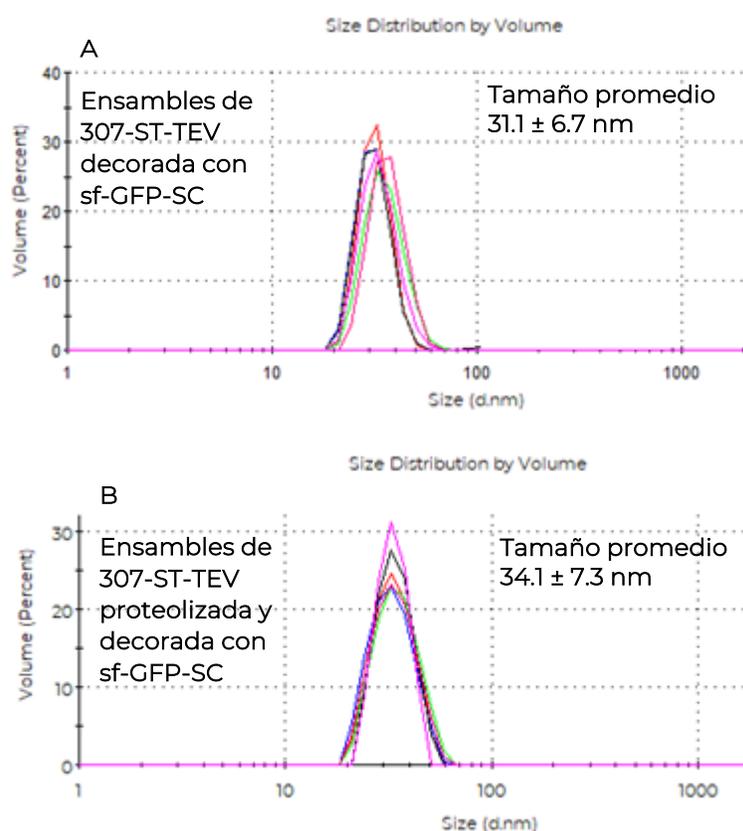


Figura 34. Distribución de tamaño de partícula mediante DLS para la fracción de mayor absorbancia purificada mediante cromatografía de exclusión molecular.

Panel A: VLPs de 307-ST-TEV decorada con sf-GFP-SC.

Figura 34. Distribución de tamaño de partícula mediante DLS para la fracción de mayor absorbancia purificada mediante cromatografía de exclusión molecular.

Panel B: VLPs de 307-ST-TEV proteolizada y decorada con sf-GFP-SC.

De acuerdo con la **Figura 34**, se encontró que las partículas de 307-ST-TEV presentaban un diámetro de partícula de 31.1 ± 6.7 nm, mientras que las mismas partículas proteolizadas con TEV mostraron un tamaño promedio de 34.1 ± 7.3 nm,

muy cercanos a los valores antes reportados para las partículas VLPs de la quimera de VP2 con sfGFP fusionada genéticamente (Bustos-Jaimes *et al.*, 2017).

Nuestro grupo de trabajo ha reportado una quimera de VP2 que tenía en el asa 301-313 a la proteína sfGFP fusionada genéticamente mediante espaciadores (linkers). Las VLPs de la quimera fluorescente mostraron un diámetro de 32.7 ± 4.5 nm (Bustos-Jaimes *et al.*, 2017). Por otra parte, la implementación del sistema SpyTag/SpyCatcher permitió unir una α -glucosidasa a la superficie de VLPs en el extremo N-terminal de VP2, y supone una ventaja pues la actividad catalítica de una enzima no se ve comprometida por las duras condiciones de purificación usadas para VP2. Las VLPs decoradas con α -glucosidasa mostraron un diámetro de 42.1 ± 9.1 nm (Cayetano-Cruz *et al.*, 2019). Los ejemplos anteriores demuestran que aún con modificaciones en ambas posiciones, las proteínas quiméricas retienen su competencia para formar VLPs. Finalmente, se ha reportado otra quimera que incorpora el péptido PreS1 en el extremo N-terminal de VP2. Este péptido se deriva del virus de la hepatitis B (VHB), y consiste únicamente de los residuos 21-47 del dominio N-terminal de la proteína del antígeno de superficie viral (HBsAg), y permite el reconocimiento de alta especificidad en líneas celulares de hepatocitos humanos. Para visualizar la interacción e internalización de las partículas con el péptido PreS1₂₁₋₄₇, se generó una VLP “híbrida” que también contuviera como pieza de autoensamble a VP2-SpyTag en el extremo N-terminal, y producir el producto bioortogonal covalente conjugando con sf-GFP-SCb. Las VLPs formadas de esta interacción lograron internalizarse en hepatocitos humanos y retuvieron su fluorescencia. Estas partículas mostraron un diámetro de 35.9 ± 8.2 nm (Cayetano-Cruz *et al.*, 2019).

6.8.2 FLUORESCENCIA DE VLPs Y ANÁLISIS POR SDS-PAGE DEL COMPLEJO sf-GFP-SCb:307-ST-TEV

Se midieron los espectros de emisión de fluorescencia a las VLPs, de acuerdo con las condiciones descritas en la metodología e interpolando en una curva estándar se obtuvo la masa de sf-GFP presente en la muestra. Se determinó el contenido de proteína total mediante BSA para estimar la cantidad de dominios de proteína

verde fluorescente acoplados a cada VLP. En la **Tabla 5** se encuentran los valores de intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias (UA) obtenidas para las VLPs conjugadas y el número aproximado de proteína verde fluorescente conjugada para cada especie. En el caso de las VLPs formadas a partir de la proteína 307-ST-TEV se obtuvo una intensidad de fluorescencia de 57586.4 ± 12.0 UA a 514 nm, en cambio, para las VLPs con tratamiento (proteasa ON a 4 °C, sin agitación y a una relación molar 1:5 de VLPs contra proteasa) se obtuvo una intensidad de fluorescencia de 77575.2 ± 21.6 UA a la misma longitud de onda. De acuerdo con los datos de fluorescencia obtenidos anteriores, y la curva de calibración, se calculó la cantidad de sf-GFP-SCb unida al péptido SpyTag asumiendo que no hay apagamiento por la unión de la sfGFP a las VLPs ni por interacciones entre los dominios de la propia sfGFP unidos a las partículas. En el caso de las VLPs de 307-ST-TEV, la masa de sf-GFP-SCb unida fue de 0.117 mg y la masa total de las partículas, sin sf-GFP-SCb, fue de 0.909 mg. El peso molecular para sf-GFP-SCb es de 40917.55 mg/mmol y de 65045.87 mg/mmol para 307-ST-TEV. Se calculó que las masas moleculares para sf-GFP-SCb y 307-ST-TEV sin tratamiento alguno corresponden a 2.857 nmol y 15.770 nmol respectivamente, la proporción molar de sf-GFP-SCb a 307-ST-TEV, fue calculada de la siguiente manera: $2.857 \text{ nmol} / 15.770 \text{ nmol} = 0.18$, que corresponde una ocupación del 18% de los sitios posibles de unión. Tomando en cuenta que cada partícula tiene 60 subunidades de la proteína 307-ST-TEV, el 18% de 60 es 10.9 que fue redondeado a 11 unidades acopladas de sf-GFP-SCb por VLP (**Tabla 5**).

Respecto a las VLPs de 307-ST-TEV proteolizada, la masa de sf-GFP-SCb unida fue de 0.157 mg y la masa total de las partículas, sin sf-GFP-SCb, fue de 0.789 mg. Se calculó que las masas moleculares para sf-GFP-SCb y 307-ST-TEV proteolizada corresponden a 3.849 nmol y 12.128 nmol respectivamente. La proporción molar de sf-GFP-SCb a 307-ST-TEV proteolizada, fue calculada de la siguiente manera: $3.849 \text{ nmol} / 12.128 \text{ nmol} = 0.317$, correspondiente al 31.7%, y por ende 19 unidades de sf-GFP-SCb por VLP fueron acopladas a esta especie (**Tabla 5**), una cantidad mayor a la VLP que no tuvo tratamiento proteolítico.

Se esperaba que las VLPs proteolizadas tuvieran un mayor número de moléculas fluorescentes acopladas ya que los aminoácidos responsables del enlace isopeptídico tendrían mayor libertad en la superficie de la partícula y por ende mayor reactividad. Esta hipótesis propuesta se cumplió, recordando que las 60 subunidades que conforman la VLP tienen un sitio reactivo, aunque la polivalencia no llega a ser total o del 100%, sino aproximadamente una tercera parte del total para las VLPs cortadas en el asa mediante TEV y una sexta parte para las VLPs con la proteína íntegra que tiene el péptido Spy Tag en el asa.

Tabla 5. Datos de fluorescencia obtenidos de las VLPs formadas por las proteínas 307-ST-TEV, y 307-ST-TEV con tratamiento de proteólisis. Los datos se adquirieron a partir de la fracción del pico colectada en la columna.

Espece	Intensidad de fluorescencia (UA) a 514 nm	Masa de VLPs (mg)	Masa de sf-GFP-SCb (mg)	Proporción Molar	# de sf-GFP-SCb unidas por VLP
307-ST-TEV + sf-GFP	57586.4 ± 12.04	0.909 (2.857 nmol)	0.117 (15.770 nmol)	0.18	10.87
307-ST-TEV con proteólisis + sf-GFP	77575.2 ± 21.65	0.789 (3.849 nmol)	0.157 (12.128 nmol)	0.317	19.04

El acoplamiento de una proteína para la VLP que fue cortada en el asa es parecido a las VLPs cuyo N-terminal expone péptidos que contienen sitios antigénicos del virus respiratorio sincitial (VSR) flanqueada con un sitio para la proteasa factor Xa entre los péptidos heterólogos y la proteína VP2, por el eje de orden 5. Se demostró que la cantidad expuesta en la superficie y suponiendo toda la fracción expuesta reaccionaría fue de ~35%, es decir, 21 péptidos disponibles para conjugar (Morán-García *et al.*, 2016). En otro artículo más reciente del grupo de trabajo, una VLP fue equipada con 50% del péptido Spy Tag en el N-terminal de VP2, y el resto con un

péptido heterólogo, el análisis de fluorescencia reveló que se acoplaron aproximadamente 10 unidades de sf-GFP-SC a las posibles 30 subunidades disponibles de la VLP, aunque hay que tomar en cuenta que el N-terminal de cada subunidad no está siempre expuesto como se mencionó anteriormente (Cayetano-Cruz *et al.*, 2019). Este resultado es análogo a la VLP que no recibió tratamiento con proteasa.

Si se realiza la conjugación para la VLP de proteína 307-ST-TEV (~60 kDa) sin cortar, con la sf-GFP-SCb (~40 kDa), la suma de los pesos moleculares daría como resultado aproximadamente 100 kDa. Este enlace no se lleva a cabo en los extremos de la proteína, sino en la parte media, y se ha visto que esto afecta su migración electroforética, generando pesos moleculares aparentes mayores al esperado. El análisis por SDS-PAGE del experimento del punto **6.9**, la conjugación de las VLPs con la sf-GFP-SCb, da como resultado lo que se observa en la **Figura 35**, carril 4, el producto de la unión entre ambas proteínas, con un peso molecular aparente mayor a 180 kDa, que no corresponde con el peso molecular esperado.

La explicación a este peso anómalo es que la proteína desnaturalizada no adquiere una forma lineal sino en forma de letra “Y”, afectando su desplazamiento a través de los poros del gel. Se observa que las bandas de los carriles 1 y 3 (correspondientes a 307-ST-TEV y sf-GFP-SCb respectivamente) reducen significativamente su concentración, quedando un leve remanente de estas proteínas en el carril 4. En el carril 2 se demuestra que es posible cortar completamente 307-ST-TEV si no se efectúan las condiciones para el ensamble, provocando que la proteína esté mal plegada e incluso parcialmente desnaturalizada. Esto sucedió cuando se llevó a cabo una diálisis incompleta, desde el amortiguador de condiciones desnaturalizantes interrumpiendo el término a ensamble de VLPs cambiando el amortiguador por agua.

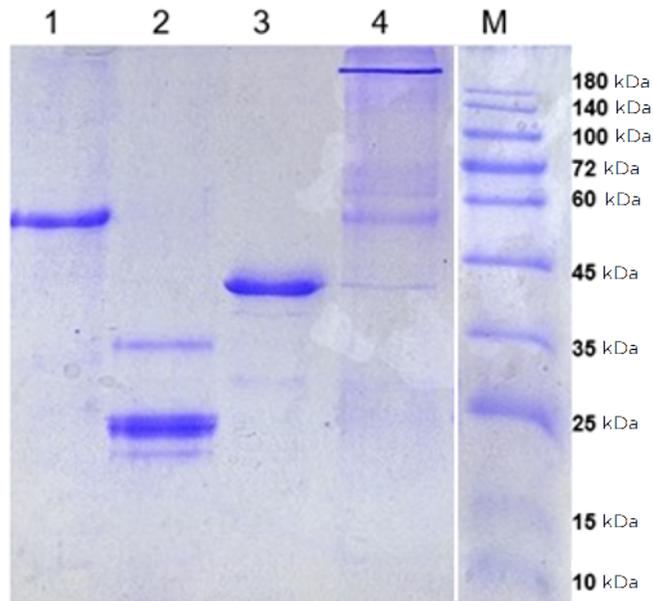


Figura 35. Enlace isopeptídico entre 307-ST-TEV y sf-GFP-SCb (en gel de poliacrilamida al 12%). Carril 1) 307-ST-TEV ~60 kDa; 2) 307-ST-TEV completamente proteolizada (~35 kDa y ~25 kDa); 3) sf-GFP-SCb (~40 kDa) 4) interacción 307-ST-TEV + sf-GFP-SCb.

Se analizaron mediante SDS-PAGE al 9% las fracciones correspondientes a los picos principales de la purificación por exclusión molecular explicada anteriormente. Se comparan las dos VLPs conjugadas, la que no tuvo el tratamiento con TEVp y la que sí lo tuvo. En ambos casos se formó una nueva banda que surge del enlace isopeptídico, aunque de dos masas distintas (**Figura 36**).

En la **Figura 36** carril 5, nuevamente observamos la unión entre 307-ST-TEV y sf-GFP-SCb (~100 kDa) mediante la aparición de una banda desplazada un poco más a la parte inferior de un gel al 9% que es de ~140 kDa, que, aunque sigue sin ser el peso molecular esperado, demuestra el corrimiento electroforético para las especies que forman un enlace covalente en otro segmento distinto del extremo -N o -C terminal. Cuando la proteína 307-ST-TEV es hidrolizada se obtienen dos segmentos, uno de ~36 kDa de peso molecular (que contiene el segmento SpyTag responsable del enlace isopeptídico) y otro menor de ~24 kDa. De la conjugación entre 307-ST-TEV proteolizada (~36 kDa) y la sf-GFP-SCb (~40 kDa) se obtiene la interacción en el peso molecular de ~72 kDa que se observa en el gel.

En los carriles 5 y 6 se observan barridos de proteína que no se hallan como contaminantes en los carriles 1, 2, y 3. Aunque no se sabe con certeza que da lugar a las bandas inespecíficas se puede suponer que son fragmentos autoproteolíticos de VP2. Esa proteína tiende a autoproteolizarse como se ha podido ver por Westernblot (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012). Es posible que el barrido observado sea interacciones de la sf-GFP-SCb con algunos de los restos de la autoproteólisis la cual es, aparentemente, común en algunos parvovirus, como el canino.

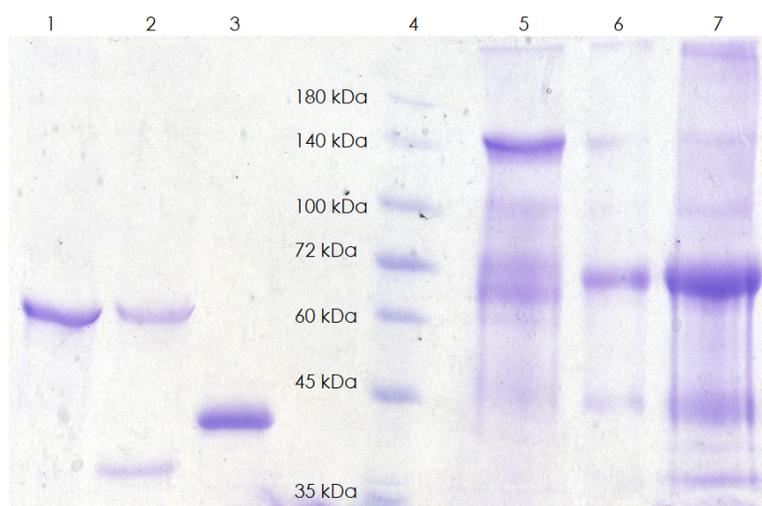


Figura 36. Enlace isopeptídico entre 307-ST-TEV y sf-GFP-SCb (en gel de agarosa al 9%). Carril 1) 307-ST-TEV ~60 kDa; 2) 307-ST-TEV parcialmente proteolizada (aparece únicamente el segmento de ~35 kDa); 3) sf-GFP-SCb (40 kDa); 4) Marcador de peso molecular (kDa); 5) interacción 307-ST-TEV + sf-GFP-SCb; 6) y 7) interacción 307-ST-TEV proteolizada + sf-GFP-SCb.

6.9 CENTRIFUGACIÓN ISOPÍCNICA

La centrifugación isopícnica es una técnica que permite separar moléculas o partículas con base en su densidad en un medio con un gradiente de densidad. El equilibrio entre la fuerza centrífuga y la fuerza de difusión provocan que los analitos se concentren en la región del gradiente donde su densidad se iguala con la densidad de la solución que los rodea.

Sánchez-Rodríguez y colaboradores identificaron dos bandas características en las muestras de VP2 sometidas a un gradiente de CsCl, y caracterizaron exhaustivamente las especies presentes en dichas bandas mediante técnicas como TEM. La banda superior con aspecto difuso presenta una densidad característica de aproximadamente 1.22 g/mL y está formada por especies intermediarias. Por otro lado, la banda inferior presenta una densidad de aproximadamente 1.28 g/mL y concentra a un conjunto uniforme de VLPs por lo cual es una banda muy definida y claramente observable.

Se realizó la ultracentrifugación isopícnica por dos motivos, el primero fue saber si las cápsides formadas a partir de 307-ST-TEV sin proteolizar y ésta misma cápside proteolizada, forman VLPs. La evidencia de que se formaron sería observar las bandas anteriormente descritas en el gradiente. En la **Figura 37** se pueden observar las dos bandas anteriormente reportadas en cada tubo: la banda inferior más densa, compacta y abundante perteneciente a las VLPs correctamente ensambladas, y en la banda superior con menor densidad, más amplia y difusa los intermediarios de ensamble. Otro motivo para realizar el experimento fue probar que las partículas eran capaces de coensamblar con VP2 u otra quimera de esta proteína.

En el experimento se dializaron, para el proceso de ensamble, 4 muestras distintas: 307-ST-TEV, 307-ST-TEV:VP2 (3:1), 307-ST-TEV:VP2 (1:1) y VP2 como control y éstas mismas con tratamiento (proteasa ON a 4 °C, sin agitación y a una relación molar 1:10 de VLPs contra proteasa).

Antes de que cada muestra se sometiera a la centrifugación, se midieron los radios hidrodinámicos por DLS, para verificar que el tamaño era acorde al tamaño de las VLPs. (**Tabla 6**). Se puede observar para las muestras proteolizadas, que la banda de intermediarios es poco clara y parece estar más cercana a la banda de VLPs (**Figura 38**).

Los resultados de la **Tabla 6** muestran los valores de densidad para la banda inferior formada únicamente por VP2 (1.28 g/mL), las VLPs formadas a partir de VP2 y 307-ST-TEV no muestran algún incremento notable de densidad siendo

cercanos a los valores previamente reportados por el grupo de trabajo (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012, 2014).

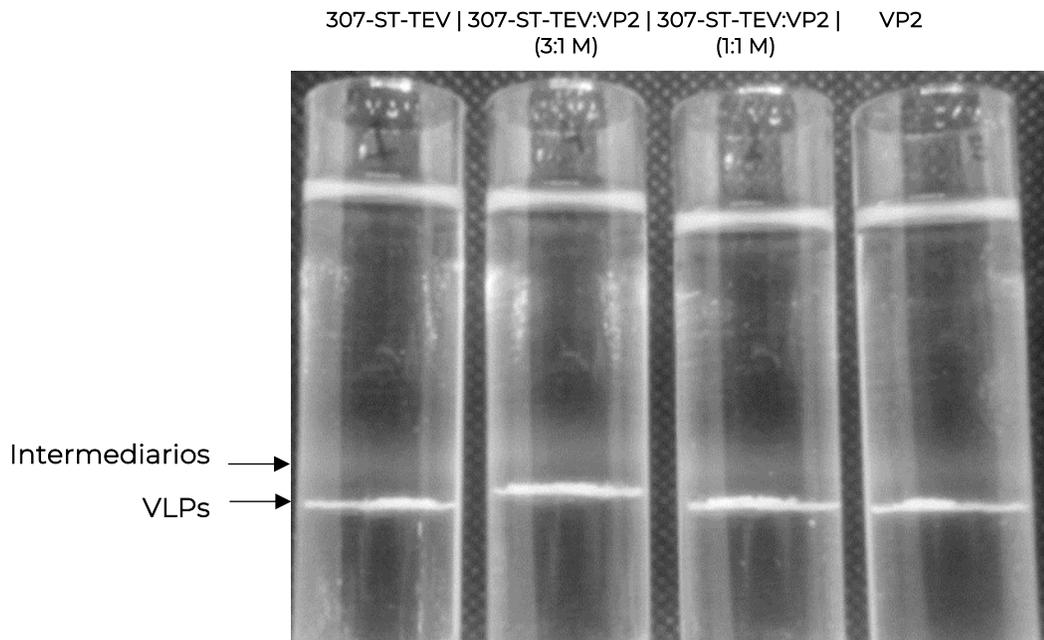


Figura 37. Ultracentrifugación isopícnica en gradientes de CsCl. Gradientes de CsCl. De izquierda a derecha: Ensamblados de proteína sin proteólisis: 307-ST-TEV, 307-ST-TEV:VP2 (3:1), VP2:307-ST-TEV (1:1), VP2. Las flechas corresponden a las bandas formadas.

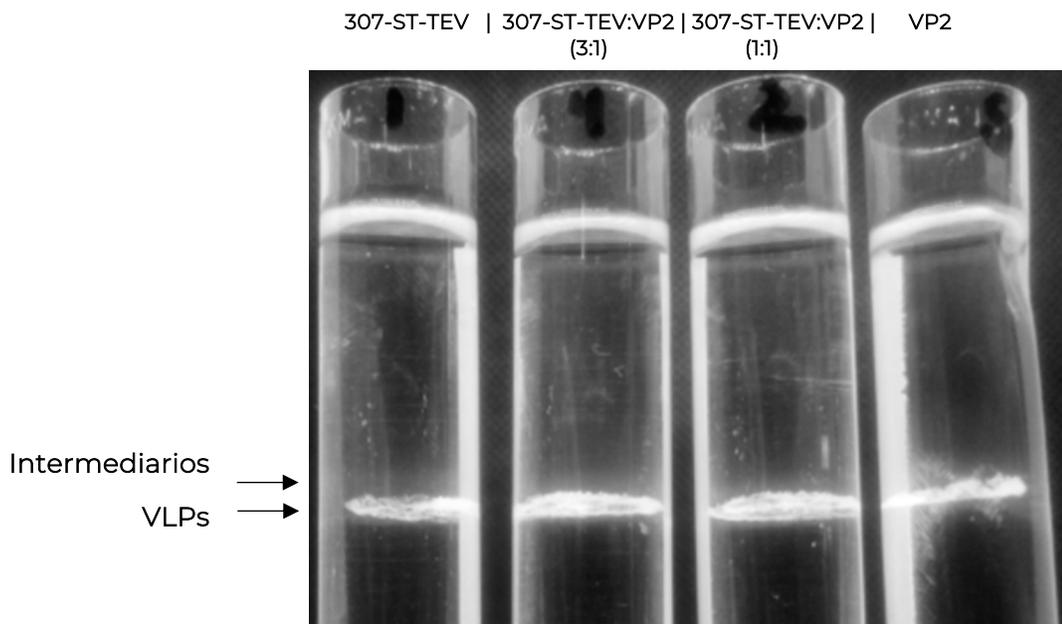


Figura 38. Ultracentrifugación isopícnica en gradientes de CsCl. Gradientes de CsCl. De izquierda a derecha: Ensamblados de proteína con TEV (1:10) ON: 307-ST-TEV, 307-ST-TEV:VP2 (3:1), VP2:307-ST-TEV (1:1), VP2. Las flechas corresponden a las bandas formadas.

Tabla 7. Medición del radio hidrodinámico antes de la centrifugación isopícnica. Y densidades de las bandas.

Proteínas ensambladas	Tamaño por DLS (% volumen)	Densidad de banda superior (g/mL)	Densidad de banda inferior (g/mL)
307-ST-TEV	21.27 ± 4.93	1.24	1.29
307-ST-TEV proteolizada	23.38 ± 4.33	1.25	1.28
307-ST-TEV- VP2 (4:1)	21.93 ± 4.51	1.24	1.29
307-ST-TEV- VP2 (4:1) proteolizada	23.48 ± 3.46	1.25	1.30
307-ST-TEV- VP2 (1:1)	22.73 ± 4.82	1.24	1.29
307-ST-TEV- VP2 (1:1) proteolizada	24.02 ± 3.73	1.25	1.30
VP2	23.02 ± 3.63	1.24	1.29
VP2 + TEV	24.31 ± 4.08	1.24	1.27

Las bandas que corresponden a las VLPs proteolizadas se analizaron mediante SDS-PAGE y se muestran en la **Figura 39**. Para el carril 5, 100% de la quimera, se obtuvo una hidrólisis del 33%. Para el carril 6, 75% de ST-TEV y restante con VP2, la hidrólisis fue de 19.4%, la incorporación aparente de VP2 fue de 24.3% lo que es muy cercano al valor teórico planeado. Para el carril 7, 50% de ST-TEV y restante con VP2, el grado de hidrólisis fue de 24.8% y la incorporación de VP2 fue de 38.7%.

Por lo que se constató que, en el caso de los coensambles, las partículas obtenidas sí incorporan la proteína VP2 y 307-ST-TEV en una proporción aproximada a la que fue planeada para la formación de las VLPs.

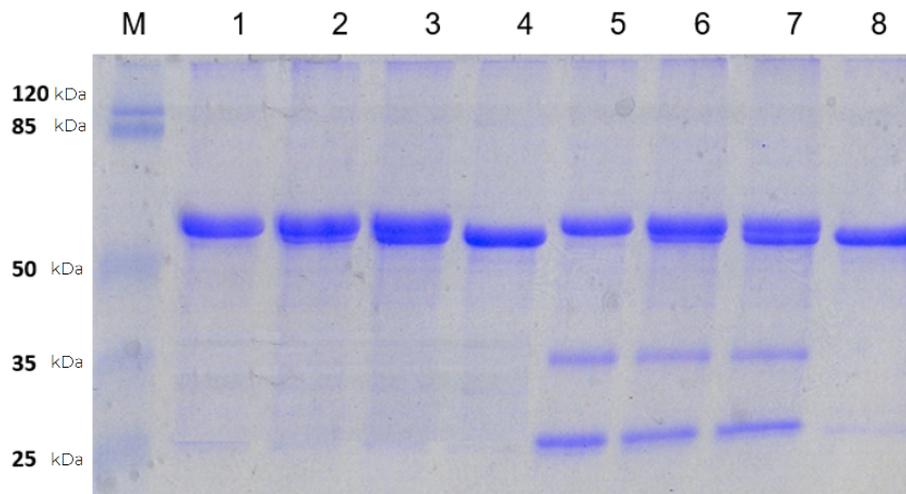


Figura 39. SDS-PAGE de las bandas obtenidas por gradientes. Ensamblados sin proteólisis, carriles: 1) 307-ST-TEV, 2) 307-ST-TEV:VP2 (3:1), 3) VP2:307-ST-TEV (1:1), 4) VP2. Ensamblados con proteólisis (1:5 ON), carriles 5) 307-ST-TEV, 6) 307-ST-TEV:VP2 (3:1), 7) VP2:307-ST-TEV (1:1), 8) VP2.

6.10 ANÁLISIS POR AFM

Para confirmar la presencia de VLPs, además de las mediciones por DLS y la centrifugación isopícnica, las partículas ensambladas se analizaron por AFM. Esta técnica puede mostrar, además de la presencia y el tamaño de las VLP, cambios notables en la superficie de las partículas. La sonda utilizada aquí permite imágenes de alta resolución de las VLP analizadas. Las imágenes AFM de la VLP 307-ST-TEV revelan una estructura esférica característica de los virus icosaédricos aparentemente entre 20-25 nm de diámetro (**Figura 40 panel A**). Las imágenes de AFM de la VLP 307-ST-TEV proteolizada permite observar también una estructura esférica aparente de ~25 nm de diámetro (**Figura 40 panel B**), estos datos concuerdan con las mediciones obtenidas mediante DLS.

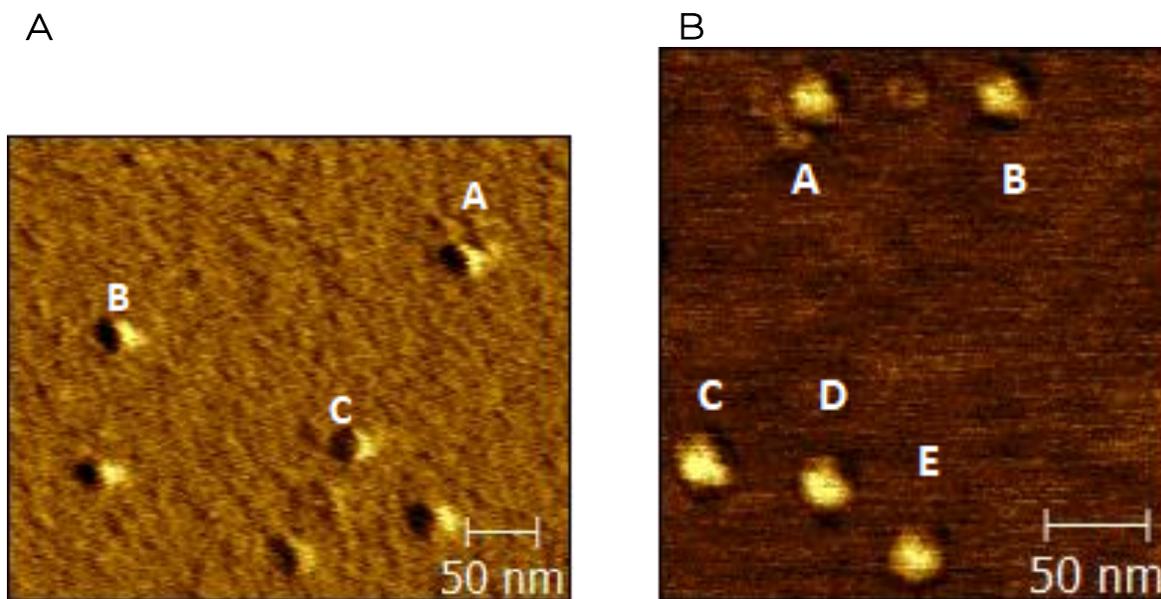


Figura 40. A) Diámetros de las VLPs 307-ST-TEV por AFM para las partículas A, 23 nm, B, 25 nm, y C, 24 nm. B) Diámetros por AFM para las partículas quiméricas proteolizadas: A, 25 nm; B, C, D y E, 26 nm.

6.11 ESTABILIDAD DE VLPS DE 307-ST-TEV

La desnaturalización química involucra un conjunto de interacciones un poco diferentes a las responsables de la formación de los estados plegados de las proteínas. Desde las interacciones específicas en una secuencia de aminoácidos de una cadena en particular: formación de puentes de hidrógeno, puentes salinos, hasta la disposición detallada de las cadenas laterales hidrófobas dentro del glóbulo de la proteína. Por el contrario, la acción de los desnaturalizantes químicos está relacionada con un proceso inespecífico de interacciones del esqueleto proteico relativamente no polar. Los desnaturalizantes interaccionan con regiones hidrófobas de diferentes partes de la proteína y al aumentar su concentración estabiliza los estados desnaturalizados por facilitar la solvatación de superficies no polares (England & Haran, 2011). El guanidinio en particular tiende a interactuar con regiones hidrofóbicas de una proteína a través de su superficie plana no polar, mientras expone sus bordes polares/cargados al solvente.

Las muestras se incubaron a distintas concentraciones del agente caotrópico GuHCl. El cambio en el tamaño de diámetro, el cual usamos como medida de la integridad de las VLPs, se siguió por DLS (**Figuras 41 y 42**).

Se pudo observar que desde 1 M de GuHCl, ambos tipos de VLPs disminuyeron sus tamaños a ~18 y ~16 nm para las especies no proteolizadas y proteolizadas respectivamente. Estos tamaños, al menos el de la especie proteolizada, coincide con el tamaño de intermediarios de ensamble, como capsómeros y oligo capsómeros, mientras que la especie sin tratamiento proteolítico podría haber perdido algunos capsómeros, pero igualmente mostraron un cambio importante. A 3.0 M del agente caotrópico aparecieron cambios más notorios, pues aparecen poblaciones minoritarias de menor tamaño, que podrían ser capsómeros (trímeros) o incluso monómeros y dímeros parcialmente plegados. A esta concentración, 3 M de GuHCl, aparecieron dos poblaciones para los dos tipos de partículas, en la especie sin tratamiento aparecieron lecturas de ~21 nm (90% del total de mediciones) y otra de 2 nm (10% del total de mediciones). Para la especie proteolizada a 3 M la especie mayoritaria fue de 2.4 nm (74% del total de mediciones) y otra de ~22 nm (26% del total de mediciones). Esta concentración de GuHCl es relativamente baja para suponer un desplegamiento del núcleo de la proteína VP2, el cual no fue modificado por la inserción del elemento heterólogo en el asa 301-313. Valga decir que la VP2 silvestre requiere más de 4 M de GuHCl para comenzar a desplegarse (Santillán-Uribe *et al.*, 2016). Por otra parte, este resultado se contrapone con el resultado observado a 1 M de GuHCl, por lo que es posible que las especies de 22 nm sean oligocapsómeros formando especies aberrantes debido a la presencia del agente caotrópico. Finalmente, a 5 y 6 M de GuHCl las partículas sin tratamiento aumentaron el radio hidrodinámico más que las especies proteolizadas. La proteína de 595 residuos es cortada en dos segmentos de 334 y 261 residuos. Así, mientras la proteína no proteolizada consta de una cadena larga que al desplegarse puede tener un diámetro hidrodinámico de ~50 nm, las especies proteolizadas solo pueden formar especies de diámetros menores y similares entre ellas.

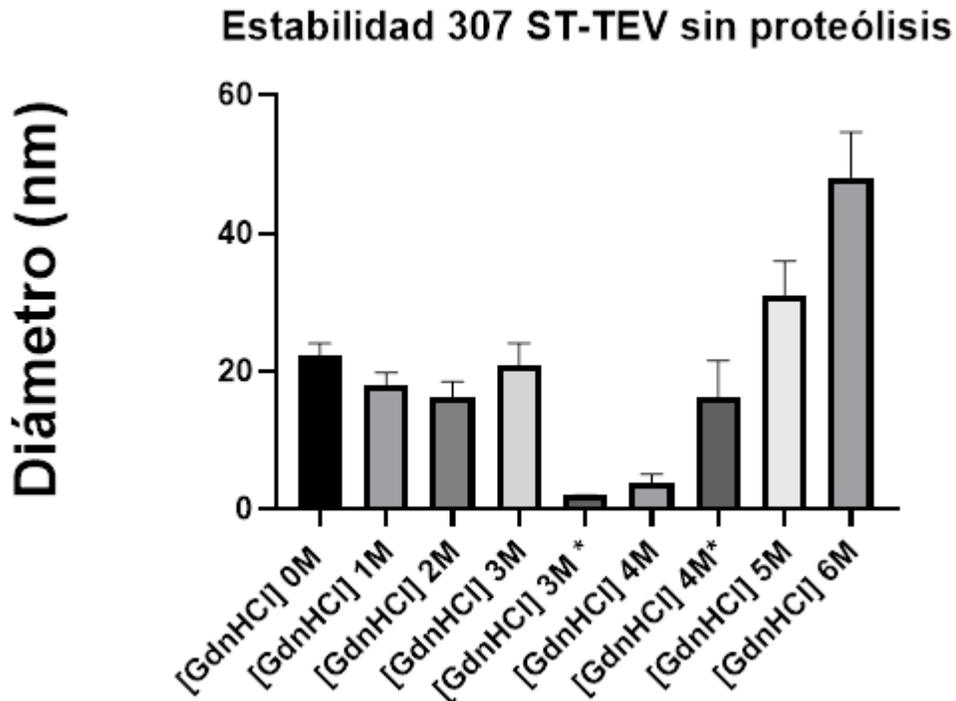


Figura 41. Gráfica de los diámetros hidrodinámicos por DLS obtenidos en el ensayo de estabilidad de VLPs de 307-ST-TEV. Evaluación en concentraciones crecientes de GuHCl. Una segunda población se marca en las concentraciones con asterisco.

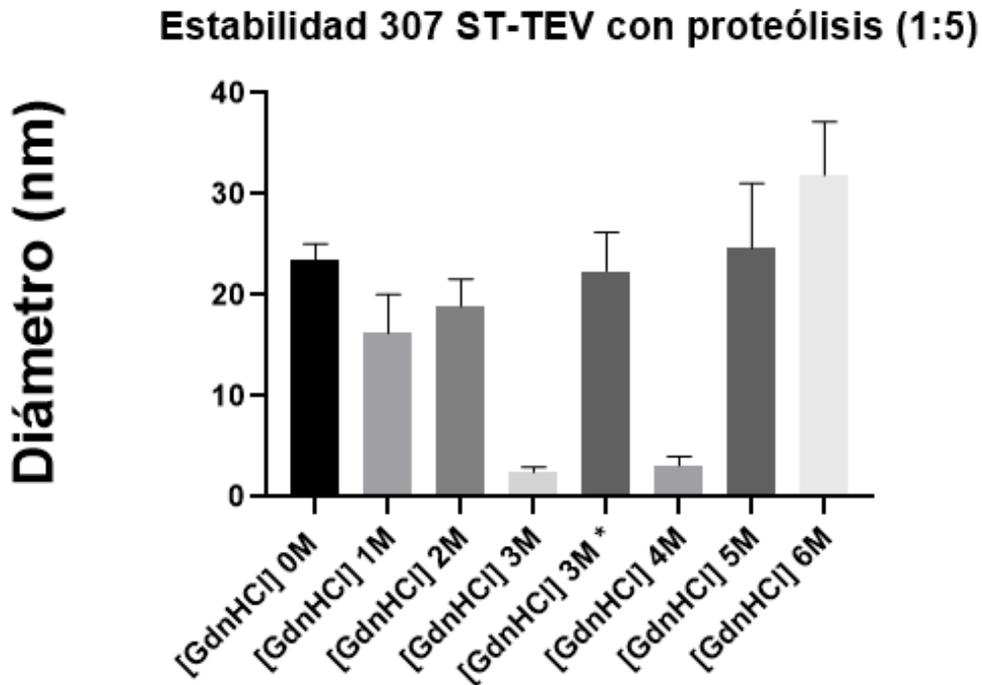


Figura 42. Gráfica de los diámetros hidrodinámicos por DLS obtenidos en el ensayo de estabilidad de VLPs de 307-ST-TEV con proteólisis (1:5). Evaluación en concentraciones crecientes de GuHCl. Una segunda población se marca en las concentraciones con asterisco.

7. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron partículas tipo virus (VLPs) de la proteína quimérica 307 ST-TEV *in vitro*. Demostramos que la inserción del péptido SpyTag en el asa 301-313, flanqueada por un sitio de corte para la proteasa no impide la formación de las VLPs y que dicho péptido es funcional ya sea fijo en el asa o liberado mediante el corte proteolítico con TEV.
- La proteólisis a diferentes relaciones molares en VLPs con 100% de la quimera no es total, se propone como explicación que existe un impedimento estérico para que la proteasa acceda a todos los sitios posibles.
- Se confirmó la bioconjugación de sfGFP con la quimera 307 ST-TEV mediante SDS-PAGE, y se estimó la cantidad de dominios de sfGFP acoplados a la VLP. Se encontró que las partículas con tratamiento proteolítico acoplaron un mayor número de proteínas verdes fluorescentes (31.7% contra un 18% sin tratamiento) de acuerdo con la hipótesis inicial.
- El uso del sistema SpyTag/SpyCatcher para unir una proteína fluorescente a la superficie de las VLPs es una excelente opción para decorar la partícula cuando la funcionalidad de la proteína se ve comprometida debido a las duras condiciones de purificación de VP2.
- La proteína quimérica es capaz de formar coensambles, es decir, VLPs en presencia de VP2 a diversas proporciones.
- Las VLPs a las cuales se les hizo un corte proteolítico en el asa son capaces de conservar su estructura de acuerdo a lo observado en DLS, AFM y SEC. Sin embargo, al medir la estabilidad con agentes caotrópicos las VLPs comienzan a desestabilizarse desde 1 M y los cambios más drásticos sucedieron a partir de 3 M de GuHCl.

8. PERSPECTIVAS

En el presente trabajo no se pudieron elaborar microscopías de transmisión electrónica debido a la suspensión de labores y actividades en la pandemia. Poder obtener alguna imagen nos permitiría conocer peculiaridades de la partícula, como la distribución de tamaños en la población, la simetría, y el acoplamiento de la sfGFP. Estudios recientes por microscopía electrónica de transmisión demostraron que la quimera 307-ST-TEV forma VLPs con la morfología esférica típica (Santillán-Uribe, comunicación personal). Es de interés evaluar si las VLPs proteolizadas y bioconjugadas mantienen su estructura como ya lo indica el análisis por AFM.

Ensamblar la quimera con el sitio de corte TEV junto con otra quimera con algún péptido de internalización para una línea celular o tejido específico de interés biomédico. Se podría evaluar la estabilidad, integridad y funcionalidad de VLPs a determinadas temperaturas. El acoplamiento de la proteína verde fluorescente nuevamente podría medirse y la presencia en una célula se podría detectar de manera sencilla experimentalmente.

9. BIBLIOGRAFÍA

Agbandje, M., McKenna, R., Rossmann, M.G., Strassheim, M.L., Parrish, C.R. (1993). Structure determination of feline panleukopenia virus empty particles. *Proteins* 16, 155 – 171.

Agbandje, M., Kajigaya, S., McKenna, R., Young, N. S., & Rossmann, M. G. (1994). The Structure of Human Parvovirus B19 at 8 Å Resolution. *Virology*, 203(1), 106–115.

Aguilar D. (2014) Modificación de asas superficiales de la proteína VP2: Efectos en la formación de partículas tipo virus. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Alas-Guardado, Salomón de J., Rojo, Arturo, & Merino, Gabriel. (2011). La paradoja de Levinthal: cuando una contradicción se vuelve lógica. *Educación química*, 22(1), 51-54. Recuperado en 13 de diciembre de 2023, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-893X2011000100009&lng=es&lng=.

Amexis, G., & Young, N. S. (2006). Parvovirus B19 Empty Capsids as Antigen Carriers for Presentation of Antigenic Determinants of Dengue 2 Virus. *The Journal of Infectious Diseases*, 194(6), 790–794.

Anderson S., Momoeda M., Kawase M., Kajigaya S., Young N.S. (1995). Peptides derived from the unique region of B19 parvovirus minor capsid protein elicit neutralizing antibodies in rabbits. *Virology* 206:626–632.

Ballou, W.R.; Reed, J.L.; Noble, W.; Young, N.S.; Koenig, S. Safety and Immunogenicity of a Recombinant Parvovirus B19 Vaccine Formulated with MF59C.1. *J. Infect. Dis.* 2003, 187, 675–678.

Bansal, G.P.; Hatfield, J.A.; Dunn, F.E.; Kramer, A.A.; Brady, F.; Riggan, C.H.; Collett, M.S.; Yoshimoto, K.; Kajigaya, S.; Young, N.S. Candidate Recombinant Vaccine for Human B19 Parvovirus. *J. Infect. Dis.* 1993, 167, 1034–1044.

Bernstein, D.I.; Sahly, H.M.E.; Keitel, W.A.; Wolff, M.; Simone, G.; Segawa, C.; Wong, S.; Shelly, D.; Young, N.S.; Dempsey, W. Safety and Immunogenicity of a Candidate Parvovirus B19 Vaccine. *Vaccine* 2011, 29, 7357–7363.

Bhattacharjee, S. DLS and Zeta Potential—What They Are and What They Are Not? *J. Control. Release* 2016, 235, 337–351.

Blommel PG, Fox BG. A combined approach to improving large-scale production of tobacco etch virus protease. *Protein Expr Purif.* (2007) Sep;55(1):53-68.

Bonsch C, Kempf C, Ros C. (2008). Interaction of parvovirus B19 with human erythrocytes alters virus structure and cell membrane integrity. *J. Virol.* 82:11784–11791.

Bonsch C., Zuercher C., Lieby P., Kempf C., & Ros C. (2010). The Globoside Receptor Triggers Structural Changes in the B19 Virus Capsid That Facilitate Virus Internalization. *Journal of Virology*, Volume 84(22), pp 11737–11746.

Brown KE., Anderson SM., Young NS. (1993). Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science* 262:114–117. <https://doi.org/10.1126/science.8211117>.

Brown, K. E., & Cohen, B. J. (1992). Haemagglutination by parvovirus B19. *Journal of General Virology*, 73(8), 2147–2149. doi:10.1099/0022-1317-73-8-2147.

Brown, K.E., Hibbs, J.R., Gallinella, G., Anderson, S.M., Lehman, E.D., McCarthy, P., Young, N.S., 1994. Resistance to parvovirus B19 infection due to lack of virus receptor (erythrocyte P antigen). *N. Engl. J. Med.* 330, 1192– 1196. <https://doi.org/10.1056/NEJM199404283301704>.

Brown, C. S., Welling-Wester, S., Feijlbrief, M., Van Lent, J. W. M., & Spaan, W. J. M. (1994). Chimeric Parvovirus B19 Capsids for the Presentation of Foreign Epitopes. *Virology*, 198(2), 477–488.

Brune, K.D.; Howarth, M. New Routes and Opportunities for Modular Construction of Particulate Vaccines: Stick, Click, and Glue. *Front. Immunol.* **2018**, 9, 1432.

Bua, G.; Manaresi, E.; Bonvicini, F.; Gallinella, G. (2016) Parvovirus B19 Replication and Expression in Differentiating Erythroid Progenitor Cells. *PLoS ONE*, 11, e0148547.

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

Caliaro, O., Marti, A., Ruprecht, N., Leisi, R., Subramanian, S., Hafenstein, S., & Ros, C. (2019). Parvovirus B19 Uncoating Occurs in the Cytoplasm without Capsid Disassembly and It Is Facilitated by Depletion of Capsid-Associated Divalent Cations. *Viruses*, 11(5), 430. doi:10.3390/v11050430.

Canaan, S., Z. Zadori, F. Ghomashchi, J. Bollinger, M. Sadilek, M. E. Moreau, P. Tijssen, and M. H. Gelb. (2004). Interfacial enzymology of parvovirus phospholipases A2. *J. Biol. Chem.* 279:14502–14508.

Carter, B. J., and P. J. Tattersall. (1991). Parvoviridae. In *Animal Virus Structure*. M. V. Nermut and A. C. Stevens, editors. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York. 325-334.

Carette, N., Engelkamp, H., Akpa, E., Pierre, S. J., Cameron, N. R., Christianen, P. C. M., Van Hest, J. C. M. (2007). *A virus-based biocatalyst*. *Nature Nanotechnology*, 2(4), 226–229. doi:10.1038/nnano.2007.76.

Cayetano-Cruz, M., Coffeen, C. F., Valadez-García, J., Montiel, C., & Bustos-Jaimes, I. (2018). Decoration of virus-like particles with an enzymatic activity of biomedical interest. *Virus Research*, 255, 1–9.

Cayetano-Cruz, M. E., Valadez-García, J., Mendez, C., & Bustos-Jaimes, I. (2019). Virus-Like Nanoparticles Derived from Parvovirus B19 Efficiently Internalize in Human Hepatocytes: A Biocompatible Delivery System for Peptides and Proteins. *ACS Applied Nano Materials*.

Chandramouli, S.; Medina-Selby, A.; Coit, D.; Schaefer, M.; Spencer, T.; Brito, L.A.; Zhang, P.; Otten, G.; Mandl, C.W.; Mason, P.W.; et al. Generation of a Parvovirus B19 Vaccine Candidate. *Vaccine* 2013, 31, 3872–3878.

Chen, A.Y., Guan, W., Lou, S., Liu, Z., Kleiboeker, S., Qiu, J. (2010). Role of erythropoietin receptor signaling in parvovirus B19 replication in human erythroid progenitor cells. *J. Virol.* 84, 12385–12396.

Chen, A. Y., Zhang E. Y., Guan W., Cheng F., Kleiboeker S., Yankee T. M., and Qiu J. (2010). The small 11kDa non-structural protein of human parvovirus B19 plays a key role in inducing apoptosis during B19 virus infection of primary erythroid progenitor cells. *Blood* 115:1070–1080.

Chen, C., Saxena, R., & Wei, G.-W. (2010). A Multiscale Model for Virus Capsid Dynamics. *International Journal of Biomedical Imaging*, 2010, 1–9. doi:10.1155/2010/308627.

Chipman PR, Agbandje-McKenna M, Kajigaya S, Brown KE, Young NS, Baker TS, Rossmann MG. Cryo-electron microscopy studies of empty capsids of human parvovirus B19 complexed with its cellular receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jul 23;93(15):7502-6. doi: 10.1073/pnas.93.15.7502.

Cesaratto, F., Burrone, O. R., & Petris, G. (2016). Tobacco Etch Virus protease: A shortcut across biotechnologies. *Journal of Biotechnology*, 231, 239–249.

Cooling LL, Koerner TA, Naides SJ. (1995). Multiple glycosphingolipids determine the tissue tropism of parvovirus B19. *J Infect Dis* 172: 1198 –1205.

Cotmore, S.F.; Tattersall, P. (2014). Parvoviruses: Small Does Not Mean Simple. *Annu. Rev. Virol.* 1, 517–537.

Cotmore, S.F., McKie, V.C., Anderson, L.J., Astell, C.R., Tattersall, P. (1986). Identification of the major structural and nonstructural proteins encoded by human parvovirus B19 and mapping of their genes by procaryotic expression of isolated genomic fragments. *J. Virol.* 60, 548– 557.

Dai, S., Wang, H., and Deng, F. (2018). Advances and challenges in enveloped virus-like particle (VLP)-based vaccines. *J. Immunol. Sci.* 2, 36–41.

Ding, X., Liu, D., Booth, G., Gao, W., & Lu, Y. (2018). Virus-Like Particle Engineering: From Rational Design to Versatile Applications. *Biotechnology Journal*, 13(5), 1700324.

Dorsch S, Liebisch G, Kaufmann B, von Landenberg P, Hoffmann JH, Drobnik W, Modrow S. (2002). The VP1 unique region of parvovirus B19 and its constituent phospholipase A2-like activity. *J. Virol.* 76:2014–2018.

Douglas, T. (2006). Viruses: Making Friends with Old Foes. *Science*, 312(5775), 873–875.

Ekman, A., Hokynar, K., Kakkola, L., Kantola, K., Hedman, L., Bonden, H., Soderlund-Venermo, M. (2007). Biological and Immunological Relations among Human Parvovirus B19 Genotypes 1 to 3. *Journal of Virology*, 81(13), 6927–6935.

England, J. L., & Haran, G. (2011). *Role of Solvation Effects in Protein Denaturation: From Thermodynamics to Single Molecules and Back. Annual Review of Physical Chemistry*, 62(1), 257–277. doi:10.1146/annurev-physchem-032210-103531.

Farr, G.A., Tattersall, P. (2004) A conserved leucine that constricts the pore through the capsid fivefold cylinder plays a central role in parvoviral infection. *Virology*. 323, 243–256. 0.

Farr G.A., Zhang L.G., Tattersall P. (2005). Parvoviral virions deploy a capsid-tethered lipolytic enzyme to breach the endosomal membrane during cell entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:17148–17153.

Filippone C., Zhi N., Wong S. (2008). VP1u phospholipase activity is critical for infectivity of full-length parvovirus B19 genomic clones. *Virology*. 374:444–52.

Fischlechner, M., & Donath, E. (2007). Viruses as Building Blocks for Materials and Devices. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(18), 3184–3193. doi:10.1002/anie.200603445.

Garland, S. M., Hernandez-Avila, M., Wheeler, C. M., Perez, G., Harper, D. M., Leodolter, S., Koutsky, L. A. (2007). Quadrivalent Vaccine against Human Papillomavirus to Prevent Anogenital Diseases. *New England Journal of Medicine*, 356(19), 1928–1943. doi:10.1056/nejmoa061760.

Gilbert, L., Toivola, J., White, D., Ihalainen, T., Smith, W., Lindholm, L., Oker-Blom, C. (2005). Molecular and structural characterization of fluorescent human parvovirus B19 virus-like particles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331(2), 527–535.

Ogracic, E. V. L., & Anderson, D. A. (2006). Virus-like particles: Passport to immune recognition. *Methods*, 40(1), 60–65. doi:10.1016/j.jymeth.2006.07.018.

Gurda, B. L., Parent, K. N., Bladek, H., Sinkovits, R. S., DiMattia, M. A., Rence, C., Castro, A., McKenna, R., Olson, N., Brown, K., Baker, T. S., Agbandje-McKenna, M. (2010). Human boca virus capsid structure: insights into the structural repertoire of the parvoviridae. *Journal of virology*, 84(12), 5880-9.

Heegaard, E. D., & Brown, K. E. (2002). Human parvovirus B19. *Clinical microbiology reviews*, 15(3), 485-505.

Jiménez-Chávez, Á.D.J.; Moreno-Fierros, L.; Bustos-Jaimes, I. Therapy with Multi-Epitope Virus-like Particles of B19 Parvovirus Reduce Tumor Growth and Lung Metastasis in an Aggressive Breast Cancer Mouse Model. *Vaccine* 2019, 37, 7256–7268.

Kajigaya S, Shimada T, Fujita S, Young NS. A genetically engineered cell line that produces empty capsids of B19 (human) parvovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Oct;86(19):7601-5.

Kamerzell, T. J., Esfandiary, R., Joshi, S. B., Middaugh, C. R., & Volkin, D. B. (2011). Protein-excipient interactions: mechanisms and biophysical characterization applied to protein formulation development. *Advanced drug delivery reviews*, 63(13), 1118–1159.

Kang H., Coulibaly F., Clow F., Proft T. & Baker E. (2007) Stabilizing Isopeptide Bonds Revealed in Gram-Positive Bacterial Pilus Structure. *Science*, Volume 318, pp1625-1628.

Kaufmann B, Baxa U, Chipman PR, Rossmann MG, Modrow S, Seckler R. (2005). Parvovirus B19 does not bind to membrane-associated globoside in vitro. *Virology* 332:189 –198. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.11.037>.

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

Kaufmann, B., Simpson, A. A., & Rossmann, M. G. (2004). *The structure of human parvovirus B19*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(32), 11628–11633. doi:10.1073/pnas.0402992101.

Kurtzman, G. J., B. J. Cohen, A. M. Field, R. Oseas, R. M. Blaese, and N. S. Young. (1989). Immune response to B19 parvovirus and an antibody defect in persistent viral infection. *J. Clin. Investig.* *84*:1114–1123.

Kushnir, N., Streatfield, S. J., & Yusibov, V. (2012). Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: Diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine*, *31*(1), 58–83. doi:10.1016/j.vaccine.2012.10.083.

Llamas-Saiz, A.L., Agbandje-McKenna, M., Wikof, W.R., Bratton, J., Tattersall, P., Rossmann, M.G. (1997). Structure determination of minute virus of mice. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* *53*, 93 – 102.

Leisi, R., Ruprecht, N., Kempf, C., & Ros, C. (2013). *Parvovirus B19 Uptake Is a Highly Selective Process Controlled by VP1u, a Novel Determinant of Viral Tropism*. *Journal of Virology*, *87*(24), 13161–13167. doi:10.1128/jvi.02548-13.

Leisi, R., von Nordheim, M., Kempf, C., & Ros, C. (2015). Specific Targeting of Proerythroblasts and Erythroleukemic Cells by the VP1u Region of Parvovirus B19. *Bioconjugate Chemistry*, *26*(9), 1923–1930. doi:10.1021/acs.bioconjchem.5b00321.

Leisi R, Von Nordheim M, Ros C, Kempf C. (2016). The VP1u receptor restricts parvovirus B19 uptake to permissive erythroid cells. *Viruses* *8*:265. <https://doi.org/10.3390/v8100265>.

Lee, S.-Y., Lim, J.-S., & Harris, M. T. (2011). Synthesis and application of virus-based hybrid nanomaterials. *Biotechnology and Bioengineering*, *109*(1), 16–30. doi:10.1002/bit.23328.

Levasseur MD, Mantri S, Hayashi T, Reichenbach M, Hehn S, Waeckerle-Men Y, Johansen P, Hilvert D. Cell-Specific Delivery Using an Engineered Protein Nanocage. *ACS Chem Biol*. 2021 May 21;16(5):838-843.

Louten, J. Chapter 2—Virus Structure and Classification. In *Essential Human Virology*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2016; pp. 19–29.

Ludwig, C., & Wagner, R. (2007). Virus-like particles—universal molecular toolboxes. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(6), 537–545.

Manaresi E., Gallinella G. (2019) Advances in the Development of Antiviral Strategies against Parvovirus B19. *Viruses*. 11(7):659. doi:10.3390/v11070659.

Mejía-Méndez JL, Vazquez-Duhalt R, Hernández LR, Sánchez-Arreola E, Bach H. Virus-like Particles: Fundamentals and Biomedical Applications. *Int J Mol Sci*. 2022 Aug 2;23(15):8579. doi: 10.3390/ijms23158579.

Miyamura, K., S. Kajigaya, M. Momoeda, S. J. Smith-Gill, and N. S. Young. (1994). Parvovirus particles as platforms for protein presentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:8507–8511.

Moffatt S, Yaegashi N, Tada K, Tanaka N, Sugamura K. (1998). Human parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein induces apoptosis in erythroid lineage cells. *J Virol*, 72:3018-28.

Mohsen, M.O.; Bachmann, M.F. Virus-like Particle Vaccinology, from Bench to Bedside. *Cell. Mol. Immunol*. 2022, 19, 993–1011.

Mohsen, M. O., Zha, L., Cabral-Miranda, G., and Bachmann, M. F. (2017). Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. *Semin. Immunol*. 34, 123–132. doi: 10.1016/j.smim.2017.08.014.

Morán-García, A.C., Rivera-Toledo, E., Echeverría, O., Vázquez-Nin, G., Gómez, B., Bustos-Jaimes, I. (2016). Peptide presentation on primate erythrovirus 1 virus-like particles: in vitro assembly, stability and immunological properties. *Virus Res*. 224, 12-18.

Munakata Y, Saito-Ito T, Kumura-Ishii K, Huang J, Koder T, Ishii T, Hirabayashi Y, Koyanagi Y, Sasaki T. (2005). Ku80 autoantigen as a cellular coreceptor for human parvovirus B19 infection. *Blood* 106:3449–3456. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-02-0536>.

Nasir W, Nilsson J, Olofsson S, Bally M, Rydell GE. (2014). Parvovirus B19 VLP recognizes globoside in supported lipid bilayers. *Virology* 456-457: 364 –369. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.04.004>.

Ning K, Zou W, Xu P, Cheng F, Zhang EY, Zhang-Chen A, Kleiboeker S, Qiu J. Identification of AXL as a co-receptor for human parvovirus B19 infection of human erythroid progenitors. *Sci Adv.* 2023 Jan 13;9(2):eade0869. doi: 10.1126/sciadv.ade0869.

Olivares-Quiroz, Luis, & García-Colín Scherer, Leopoldo. (2004). Plegamiento de las proteínas: Un problema interdisciplinario. *Revista de la Sociedad Química de México*, 48(1), 95-105. Recuperado el 13 de diciembre de 2023, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0583-76932004000100014&lng=es&tlng=es.

Ogasawara, Y.; Amexis, G.; Yamaguchi, H.; Kajigaya, S.; Leppla, S.H.; Young, N.S. Recombinant Viral-like Particles of Parvovirus B19 as Antigen Carriers of Anthrax Protective Antigen. *In Vivo* **2006**, 20, 319–324.

Ozawa K, Ayub J, Kajigaya S, Shimada T, Young NS. (1988). The gene encoding the nonstructural protein of B19 (human) parvovirus may be lethal in transfected cells. *J Virol*, 62:2884-9. 23.

Ozawa, K., Kurtzman, G., and Young, N. (1987) Productive infection by B19 parvovirus of human erythroid bone marrow cells in vitro. *Blood* 70, 384–91.

Ozawa K., and Young, N.S. (1987). Characterization of capsid and noncapsid proteins of B19 parvovirus propagated in human erythroid bone marrow cell cultures. *J. Virol.* 61:2627–2630.

Padron, E., Bowman, V., Kaludov, N., Govindasamy, L., Levy, H., Nick, P., McKenna, R., Muzyczka, N., Chiorini, J.A., Baker, T.S., Agbandje McKenna, M. (2005). Structure of adeno-associated virus type 4. *J. Virol.* 79, 5047 – 5058.

Pédelacq JD, Cabantous S, Tran T, Terwilliger TC, Waldo GS. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat Biotechnol.* 2006 Jan;24(1):79-88.

Prevelige, P. E. (1998). Inhabiting virus-capsid assembly by altering polymerisation pathways. *Trends in Biotechnology*, 16(2), 61–65.

Qiu, J., Söderlund-Venermo, M., & Young, N. S. (2016). *Human Parvoviruses. Clinical Microbiology Reviews*, 30(1), 43–113. doi:10.1128/cmr.00040-16.

Quattrocchi, S.; Ruprecht, N.; Bonsch, C.; Bieli, S.; Zurcher, C.; Boller, K.; Kempf, C.; Ros, C. (2012) Characterization of the early steps of human parvovirus B19 infection. *J. Virol.* 86, 9274–9284.

Rayment, F. B., E. Crosdale, D. J. Morris, J. R. Pattison, P. Talbot, and J. J. Clare. (1990). The production of human parvovirus capsid proteins in *Escherichia coli* and their potential as diagnostic antigens. *J. Gen. Virol.* 71:2665-2672.

Reddington S. & Howarth M. (2015). Secrets of a covalent interaction for biomaterials and biotechnology: SpyTag and SpyCatcher. *Current Opinion in Chemical Biology*. Volume 29, pp 94-99. doi:10.1016/j.cbpa.2015.10.002.

Reid, B. G., & Flynn, G. C. (1997). *Chromophore Formation in Green Fluorescent Protein. Biochemistry*, 36(22), 6786–6791.

Ros, C., Baltzer, C., Mani, B., & Kempf, C. (2006). Parvovirus uncoating in vitro reveals a mechanism of DNA release without capsid disassembly and striking differences in encapsidated DNA stability. *Virology*, 345(1), 137–147. doi:10.1016/j.virol.2005.09.030.

Ros C, Gerber M, Kempf C. (2006). Conformational changes in the VP1- unique region of native human parvovirus B19 lead to exposure of internal sequences that play a role in virus neutralization and infectivity. *J Virol* 80:12017–12024. <https://doi.org/10.1128/JVI.01435-06>.

Rosenfeld, S. J., Yoshimoto, K., Kajigaya, S., Anderson, S., Young, N. S., Field, A., Warrener, P., Bansal, G., & Collett, M. S. (1992). Unique region of the minor capsid protein of human parvovirus B19 is exposed on the virion surface. *The Journal of clinical investigation*, 89(6), 2023–2029. doi:10.1172/JCI115812.

Saikawa T., Anderson S., Momoeda M., Kajigaya S., Young N.S. (1993). Neutralizing linear epitopes of B19 parvovirus cluster in the VP1 unique and VP1-VP2 junction regions. *J. Virol.* 67:3004–3009.

Salazar-González, J.A.; Ruiz-Cruz, A.A.; Bustos-Jaimes, I.; Moreno-Fierros, L. Expression of Breast Cancer-Related Epitopes Targeting the IGF-1 Receptor in Chimeric Human Parvovirus B19 Virus-Like Particles. *Mol. Biotechnol.* 2019, 61, 742–753.

Sánchez-Moguel I, Montiel C, Bustos-Jaimes I. Therapeutic Potential of Engineered Virus-like Particles of Parvovirus B19. *Pathogens.* 2023 Aug 2;12(8):1007. doi:10.3390/pathogens12081007.

Sánchez-Rodríguez, S. P., Münch-Anguiano, L., Echeverría, O., Vázquez-Nin, G., Mora-Pale, M., Dordick, J. S., & Bustos-Jaimes, I. (2012). Human parvovirus B19 virus-like particles: In vitro assembly and stability. *Biochimie*, 94(3), 870–878.

Sánchez-Rodríguez, S. P., Morán-García, A. del C., Bolonduro, O., Dordick, J. S., & Bustos-Jaimes, I. (2016). Enhanced assembly and colloidal stabilization of primate erythrovirus 1 virus-like particles for improved surface engineering. *Acta Biomaterialia*, 35, 206–214.

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

Servant-Delmas, A., Lefrere, J.-J., Morinet, F., & Pillet, S. (2010). Advances in Human B19 Erythrovirus Biology. *Journal of Virology*, 84(19), 9658–9665.

Servant-Delmas, A., & Morinet, F. (2016). *Update of the human parvovirus B19 biology. Transfusion Clinique et Biologique*, 23(1), 5–12. doi:10.1016/j.tracli.2015.11.006.

Shao, S.; Wang, Q.; Jin, Y.; Zhang, X.; Liu, Z.; Chen, S.; Wu, H.; Yang, S.; Tang, F.; Su, J.; et al. Recombinant Virus-like Particles of Human Parvovirus B19 with the Internal

Location of VP1 Unique Region Produced by Hansenula Polymorpha. *Viruses* **2022**, 14, 2410.

Shirbaghaee, Z., & Bolhassani, A. (2015). Different applications of virus-like particles in biology and medicine: Vaccination and delivery systems. *Biopolymers*, 105(3), 113–132.

Simpson, A.A., Chipman, P.R., Baker, T.S., Tijssen, P., Rossmann, M.G. (1998). The structure of an insect parvovirus (*Galleria mellonella* densovirus) at 3.7 Å resolution. *Structure* 6, 1355 – 1367.

Simpson, A.A., Hebert, B., Sullivan, G.M., Parrish, C.R., Zadori, Z., Tijssen, P., Rossmann, M.G. (2002). The structure of porcine parvovirus: comparison with related viruses. *J. Mol. Biol.* 315, 1189 – 1198.

Singh P., González M.J., Manchester M. (2006). Viruses and Their Uses in Nanotechnology. *Drug Develop. Res.*, 67: 23-41.

Soto, C. M., & Ratna, B. R. (2010). Virus hybrids as nanomaterials for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(4), 426–438.

Steinmetz, N. F. (2010). Viral nanoparticles as platforms for next-generation therapeutics and imaging devices. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(5), 634–641. doi:10.1016/j.nano.2010.04.005.

Sun, Y., Klose, T., Liu, Y., Modrow, S., & Rossmann, M. G. (2019). Structure of parvovirus B19 decorated by Fabs from a human antibody. *Journal of Virology*. doi:10.1128/jvi.01732-18.

Suzuki, H.; Noguchi, T.; Matsugu, N.; Suzuki, A.; Kimura, S.; Onishi, M.; Kosaka, M.; Miyazato, P.; Morita, E.; Ebina, H. Safety and Immunogenicity of Parvovirus B19 Virus-like Particle Vaccine Lacking Phospholipase A2 Activity. *Vaccine* **2022**, 40, 6100–6106.

Takahashi, R., Kanesashi, S., Inoue, T., Enomoto, T., Kawano, M., Tsukamoto, H., Handa, H. (2008). *Presentation of functional foreign peptides on the surface of SV40 virus-like particles. Journal of Biotechnology*, 135(4), 385–392. doi:10.1016/j.jbiotec.2008.05.012.

Takahashi T, Ozawa K, Takahashi K, Asano S, Takaku F. (1990). Susceptibility of human erythropoietic cells to B19 parvovirus in vitro increases with differentiation. *Blood* 75:603– 610.

Tariq, H.; Batool, S.; Asif, S.; Ali, M.; Abbasi, B.H. Virus-Like Particles: Revolutionary Platforms for Developing Vaccines Against Emerging Infectious Diseases. *Front. Microbiol.* 2022, 12, 790121.

Telford J., Barocchi M., Margarit I., Rappuoli R., Grandi G. (2006) Pili in gram positive pathogens. *Nature Reviews Microbiology*. Volume 4(7), pp 509-19.

Tsao, J., Chapman, M.S., Agbandje, M., Keller, W., Smith, K., Wu, H., Luo, M., Smith, T.J., Rossmann, M.G., Compans, R.W., Parrish, C.R. (1991). The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science* 251, 1456 – 1464.

Tsien, R. (1998). The Green Fluorescent Protein. *Annu Rev Biochem.* 67. 509-44.

Tu, M., Liu, F., Chen, S., Wang, M., & Cheng, A. (2015). Role of capsid proteins in parvoviruses infection. *Virology Journal*, 12(1). doi:10.1186/s12985-015-0344-y.

Tzang, B. S., G. J. Tsay, Y. J. Lee, C. Li, Y. S. Sun, and T. C. Hsu. (2007). The association of VP1 unique region protein in acute parvovirus B19 infection and anti-phospholipid antibody production. *Clin. Chim. Acta* 378:59–65.

Veggiani, G., Zakeri, B., & Howarth, M. (2014). Superglue from bacteria: unbreakable bridges for protein nanotechnology. *Trends in Biotechnology*, 32(10), 506–512.

Villa, L. L., Costa, R. L., Petta, C. A., Andrade, R. P., Ault, K. A., Giuliano, A. R., Wheeler, C. M., Koutsky, L. A., Malm, C., Lehtinen, M., Skjeldestad, F. E., Olsson, S. E., Steinwall, M., Brown, D. R., Kurman, R. J., Ronnett, B. M., Stoler, M. H., Ferenczy, A., Harper, D. M., Tamms, G. M., ... Barr, E. (2005). Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *The Lancet. Oncology*, 6(5), 271–278.

Vihinen-Ranta M, Wang D, Weichert WS, Parrish CR. (2002). The VP1 N-terminal sequence of canine parvovirus affects nuclear transport of capsids and efficient cell infection. *J. Virol.* 76:1884–1891.

Weigel-Kelley KA, Yoder MC, Srivastava A. (2001). Recombinant human parvovirus B19 vectors: erythrocyte P antigen is necessary but not sufficient for successful transduction of human hematopoietic cells. *J Virol* 75: 4110 –4116. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.9.4110-4116.2001>.

Weigel-Kelley KA, Yoder MC, Srivastava A. (2003). Alpha5beta1 integrin as a cellular coreceptor for human parvovirus B19: requirement of functional activation of beta1 integrin for viral entry. *Blood* 102:3927–3933. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1522>.

Wong, S.; Zhi, N.; Filippone, C.; Keyvanfar, K.; Kajigaya, S.; Brown, K.E.; Young, N.S. (2008). Ex vivo-generated CD36+ erythroid progenitors are highly permissive to human parvovirus B19 replication. *J. Virol.* 82, 2470–2476.

Xie, Q., Bu, W., Bhatia, S., Hare, J., Somasundaram, T., Azzi, A., Chapman, M.S. (2002). The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 10405 – 10410.

Xie, Q., Chapman, M.S. (1996). Canine parvovirus capsid structure, analyzed at 2.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 264, 497 – 520.

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

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.

Yoo, J.-W., Irvine, D. J., Discher, D. E., & Mitragotri, S. (2011). Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(7), 521–535.

Young, N. S., & Brown, K. E. (2004). Parvovirus B19. *New England Journal of Medicine*, 350(6), 586–597. doi:10.1056/nejmra030840.

Zádori, Z., Szelei, J., Lacoste, M.-C., Li, Y., Gariépy, S., Raymond, P., Tijssen, P. (2001). A Viral Phospholipase A2 Is Required for Parvovirus Infectivity. *Developmental Cell*, 1(2), 291–302.

Zakeri, B., Fierer, J. O., Celik, E., Chittock, E. C., Schwarz-Linek, U., Moy, V. T., & Howarth, M. (2012). Peptide tag forming a rapid covalent bond to a protein, through engineering a bacterial adhesin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(12), E690–E697.

Zhi N, Mills IP, Lu J, Wong S, Filippone C, Brown KE. (2006) Molecular and functional analyses of a human parvovirus B19 infectious clone demonstrates essential roles for NS1, VP1, and the 11-kilodalton protein in virus replication and infectivity. *J.Virol.* 80:5941–5950.

Zuffi, E., E. Manaresi, G. Gallinella, G. A. Gentilomi, S. Venturoli, M. Zerbini, and M. Musiani. (2001). Identification of an immunodominant peptide in the parvovirus B19 VP1 unique region able to elicit a long-lasting immune response in humans. *Viral Immunol.* 14:151–158.

10. ANEXO

A.1 MATERIALES

1,4-Ditiotreitol (DTT)	Fenol Saturado con Tris-HCl
Acetato de Potasio (KCH_3CO_2)	Fosfato de Potasio monobásico (KH_2PO_4)
Ácido bicinconínico Kit (BSA)	Fosfato de Sodio dibásico (Na_2HPO_4)
Ácido clorhídrico	Fosfato de Sodio monobásico (NaH_2PO_4)
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	Glicerol
Agar bacteriológico	Glucosa
Agarosa UltraPure®	Hidróxido de sodio (NaOH)
Albúmina	Imidazol
Ampicilina	Isopropanol
Bromuro de etidio	Isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosido (IPTG)
Cloranfenicol	L-Arginina
Clorhidrato de Guanidina (GuHCl)	Ligasa de ADN de T4
Cloroformo	Lisozima
Cloruro de Cesio (CsCl)	Matriz para cromatografía de afinidad Protino™ Ni-TED
Cloruro de Potasio (KCl)	Matriz para cromatografía de exclusión molecular GE Sephacryl S-500 HR
Cloruro de Sodio (NaCl)	Medio LB (Luria-Bertani)
Cutsmart (Amortiguador para digestión enzimática)	Membrana para diálisis
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Metanol
ADN Polimerasa de alta fidelidad (HFTaq)	Sulfato de Níquel ($NiSO_4$)
dNTP Mix	Tris-HCl
Dodecilsulfato de Sodio (SDS)	Tritón X-100
Etanol	

A.2 INSTRUMENTOS Y EQUIPO

Instrumento o equipo	Marca
Amicon Ultra-15 (30 kDa)	Millipore
Balanza analítica BP 221S	Sartorius
Balanza de dos platos	Ohaus
Baño Refrigerante	Hofer Scientific Instruments
Centrifuga refrigerada 5702 R	Eppendorf
Centrifuga refrigerada RC 6+	Thermo Scientific Instruments
Cromatógrafo de líquidos de alta resolución	Waters
Cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC) Äkta	Äkta
Espectrofluorómetro PC1	ISS
Espectrofotómetro Biochrome	Libra
Fuente de poder PS 500XT	Hofer Scientific Instruments
Incubadora MaxQ400	Thermo Scientific
Microcentrifuga refrigerada 5418	Eppendorf
Micro pipetas (1, 2.5, 10, 100, 200, 1000)	Eppendorf/Gilson
Microscopio de fuerza atómica	Innova Veeco Instruments Inc
Potenciómetro pH 700	Oakton
Speed Vac SC110	Savant
Sonicador CPX 750	Cole Parmer
Termociclador T100®	BIO RAD
Termomixer confort	Eppendorf
Trans-iluminador UV T1203	Sigma
Vórtex	Gilson
Zetataiser μ V	Malvern Instruments

A.3 CEPAS

<i>E. coli</i>	Genotipo	Fuente
BL21(DE3)	F- ompT- hsdS _B (r _B - m _B -) gal dcm (λclts857 ind Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1)	Novagen
BL21(DE3)pLysS	F-, ompT, hsdSB (r _B -, m _B -), dcm, gal, λ(DE3), pLysS, Cm ^r	Promega
DH5α	F- φ 80lacZ ΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(r _K -, m _K +) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1	Invitrogen
BL21-CodonPlus(DE3)- RIL	F- ompT hsdS(r _B - m _B -) dcm ⁺ Tet ^r gal λ(DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam ^r	Agilent

A.4 PREPARACIÓN DE CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES

1. Se creció un cultivo Over Night (ON) en placa con medio Luria Bertani (LB) sin antibiótico de la bacteria de interés (estrías por agotamiento).
2. Se eligió una colonia aislada y se inoculó 10 mL de medio LB sin antibiótico y se dejó ON.
3. Se diluyó el cultivo 1:100 en medio LB sin antibiótico: se tomaron 500 μL del medio y se inoculan en 50 mL de medio LB.
4. Se incubó con agitación orbital de 220 rpm a 37 °C hasta una densidad óptica de 600 nm (D.O. 600).
5. Posterior a estos pasos se trabajó en área estéril (campana de flujo laminar) y lo más frío posible.
6. Inmediatamente después de retirar de la incubadora, se colocó el matraz en hielo y se cosechan las células por centrifugación a 4000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.
7. Se decantó el medio y se resuspendieron las células en el volumen original del amortiguador de lavado frío (CaCl₂ 500 mM y glicerol al 15%)
8. Se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.
9. Se decantó la solución y se resuspendieron las células en el volumen original de amortiguador de lavado frío.
10. Se incuban en hielo durante 30 minutos.

11. Se cosechan las células a 4000 r.p.m. durante 15 minutos
12. Se decantó la solución y se resuspendió el pellet en 3 mL de amortiguador de lavado frío.
13. Se alicuotaron 60 μ L de las células en Eppendorf de 600 μ L. Conforme se realiza este paso se sumergen en hielo seco-metanol.
14. Se guardan a -70°C .

A.5 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES

1. Se tomó un tubo con 60 μ L de células quimiocompetentes de *E. coli* BL21(DE3), almacenadas a -70°C y se colocaron en hielo. En condiciones de esterilidad se les agregaron 2 μ L del plásmido resuspendido en agua estéril y se incubaron en hielo por 30 min.
2. Pasado este primer tiempo de incubación, las células se pusieron a incubar inmediatamente en un termomixer previamente calentado a 42°C por 60 s para generar el choque térmico.
3. Después de esta segunda incubación se volvió a poner en hielo el tubo por 2 min y nuevamente se le agregaron 250 μ L de medio LB. Posteriormente se incubó el tubo a 37°C por 1.5 h con agitación orbital a 250 rpm.
4. Después de la etapa de recuperación se procedió a inocular las células en placas de medio LB con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), para lo cual se añaden 25, 50 o 100 μ L del medio con células en cada caja y se le distribuye mediante perlas de vidrio estériles para favorecer la obtención de colonias aisladas.
5. Las cajas se colocaron en la incubadora y se dejaron creciendo por 16 h a 37°C . Una vez que pasó el tiempo de incubación se observaron las cajas que presentaron colonias y se las colocó en el cuarto frío a 5°C para retrasar su crecimiento.

A.6 PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO (MINIPREP)

1. Se seleccionó una colonia aislada y se le puso a crecer en tubos de 10 mL con medio LB y el antibiótico de selección, hasta que alcanzaron una densidad óptica de 0.6 a 600 nm.
2. En este punto se tomaron 10 mL del cultivo para preparar y se centrifugó en tubos Falcon de 15 mL a 4000 r.p.m. durante 2 min, se descartó el sobrenadante.
3. Al pellet obtenido se lo resuspendió en 200 μ L de una solución para lisis celular, compuesta de: glucosa 50 mM, Tris-HCL 25 mM a pH 8, EDTA 10 mM y 5 mg/mL de lizozima. Ya mezclado se incubó a 37°C durante 30 min.
4. Una vez que pasó el tiempo de incubación, se le adicionaron 400 μ L de una solución de NaOH 0.2 M y SDS al 4%. Se utilizó un vortex para homogenizar la solución y se la puso a incubar en hielo durante 10 min.
5. Después de que transcurrieron los 10 min se le agregaron 150 μ L de una solución 5 M de acetato de potasio (pH 5) y nuevamente se puso a incubar por otros 10 min.
6. Para separar el ADN plasmídico de los restos celulares, se centrifugó el tubo falcon a 4000 r.p.m. durante 5 min a temperatura ambiente. Al final se toman aproximadamente 750 μ L del sobrenadante y se los puso en un tubo eppendorf nuevo.
7. A este sobrenadante se le agregó el mismo volumen de solución fenol/cloroformo saturado de amortiguador y se mezcló invirtiendo el tubo suavemente. Para separar el ADN plasmídico de proteínas y otros restos celulares se centrifugó a 14,000 r.p.m. por 5 min.
8. Después de la formación de las dos fases, se tomó la fase superior que es la fase acuosa, que contiene el ADN plasmídico. De ésta, se tomó el mayor volumen posible tratando de no revolverla con la otra fase.

9. Para poder precipitar el ADN plasmídico de esta fase, se mezcló con un volumen igual de isopropanol en un tubo nuevo y se lo dejó incubando a 5°C por 3 h.
10. Posteriormente se recolectó el ADN plasmídico mediante centrifugación (14000 rpm durante 15 min) a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y al pellet obtenido se lo lavó con etanol al 80%; este paso se repitió otras 2 veces. Por último, el ADN se secó al vacío en el equipo de liofilización Speed Vac.
11. Finalmente, se resuspendió el ADN plasmídico en 25 µL de agua desionizada estéril y se le agregó 0.5 µL de ARNsa para eliminar cualquier resto de ARN que pudiera tener. Se incubó por 1 h a 37°C antes de guardarlo o volverlo a liofilizar, dependiendo si el uso es inmediato o no.

A.7 PROTOCOLO DE EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEASA TEV

El plásmido que codifica a la proteasa TEV carente de los últimos 4 residuos C-terminal para evitar autoproteólisis (pMHT Δ 238 TEV), está subclonado entre los sitios de restricción *Xho*I y *Xba*I del vector de expresión pBR322 con casete de resistencia a kanamicina, y que codifica para MBP-His7-TEV (Figura 43). La expresión se llevó a cabo en *E. coli* BL21 RIL en medio mínimo MDAG ON a 37 °C.

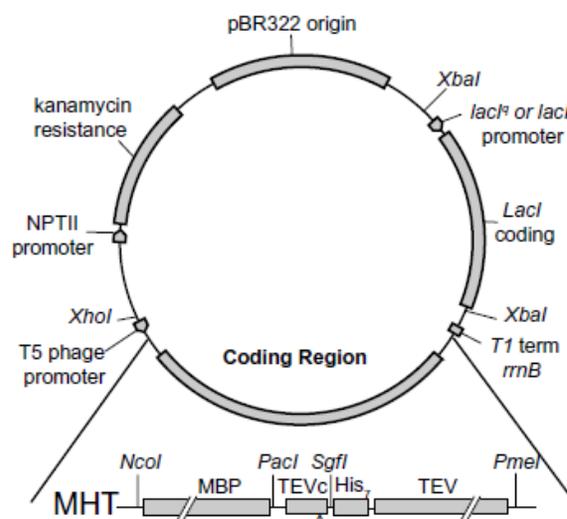


Figura 43. El plásmido pMHT238 Δ dentro del pBR322 con casete de resistencia a kanamicina, codifica para MBP-His7-TEV: proteína de unión a maltosa (MBP), 7 residuos de histidina (His7) y la TEVp con un sitio de corte para la TEVp entre MBP y la secuencia His7.

- Medio MDAG

	V _f = 50 mL
MgSO ₄ 1 M	0.1 mL
Solución de metales traza 1000X	0.01 mL
Solución 50X M	1 mL
Glucosa 20%	2 mL
Ácido aspártico 25%	0.75 mL

Añadir agua estéril cuanto baste para 50 mL

- Solución de metales traza 1000X

*Todas las soluciones deben esterilizarse a excepción del 0.1 M FeCl₃ y guardarse a temperatura ambiente. Para preparar 100 mL añadir los mL requeridos de solución Stock

Compuesto Químico y fórmula	Peso molecular (g/mol)	Solución stock (mL)	Masa para 20 mL de solución stock (g)	Concentración de la Solución Stock (M)
Cloruro de Hierro hexahidratado (FeCl ₃ ·6H ₂ O) disuelto en 0.1 M de HCl	270.30	*	0.5400	0.1
Cloruro de calcio (CaCl ₂)	110.99	2.0	2.2198	1.0
Cloruro de manganeso tetrahidratado (MnCl ₂ ·4H ₂ O)	197.91	1.0	3.9580	1.0

Sulfato de zinc (ZnSO ₄ ·7 H ₂ O)	287.56	1.0	5.7510	1.0
Cloruro de cobalto hexahidratado (CoCl ₂ ·6H ₂ O)	237.95	1.0	0.9517	0.2
Cloruro de Cobre (CuCl ₂)	170.48	2.0	0.3409	0.1
Cloruro de Níquel (NiCl ₂)	237.72	1.0	0.9510	0.2
Molibdato de sodio pentahidratado (Na ₂ MoO ₄ ·5H ₂ O)	241.98	2.0	0.4839	0.1
Selenito de sodio pentahidratado (Na ₂ SeO ₃ ·5 H ₂ O)	263.03	2.0	0.5260	0.1
Ácido Bórico (H ₃ BO ₃)	61.83	2.0	0.1236	0.1

- Solución 50X M

	V _f = 10 mL	Peso molecular	50X
Na ₂ HPO ₄	1.775 g	142	1.25 M
KH ₂ PO ₄	1.7 g	136.1	1.25 M
NH ₄ Cl	1.34 g	53.49	1.25 M
Na ₂ SO ₄	0.355 g	142	0.25 M

Esterilizar en autoclave

Posteriormente se agregó el inoculo inicial a 1 L de medio "Terrific Broth" (pH 7) para autoinducción durante 12 h a 37 °C sin monitoreo adicional, se agregaron 100 µg/mL de kanamicina y 34 µg/mL de cloranfenicol para seleccionar las clonas transformadas.

- “Terrific Broth” para auto-inducción

	$V_f = 1000 \text{ mL}$
Triptona	12 g
Extracto de levadura	24 g
Glicerol	8 mL
K_2HPO_4	9.4 g
KH_2PO_4	2.2 g
Esterilizar en autoclave y después añadir las siguientes soluciones estériles	
Lactosa	12.5 mL Solución al 20%
Glucosa	3.75 mL Solución al 20%
$MgSO_4$	1 mL Solución 1 M

Se centrifugaron las células a 5.000 rpm durante 10 min y se resuspendió el sedimento celular en Amortiguador A_{TEV} (0.5 M NaCl, 0.05 M K_2HPO_4 , 0.3 M DTT, 0.02 M Imidazol) en una proporción de 6 mL de amortiguador por gramo de pasta celular. Posteriormente se sonicó en cama de hielo con pulsos de 20 s y pausas de 30 s durante 20 min y se centrifugaron a 15000 rpm por 20 min a 4 °C para recuperar la proteína ubicada en el sobrenadante. Al verificarse la sobreexpresión de la proteína mediante SDS-PAGE, se observan dos bandas principales: TEVp de ~26 kDa y la MBP autoescindida de ~42 KDa (**Figura 44**).

La purificación de la proteasa se realizó con el sobrenadante recuperado y se cargó a una columna de afinidad Protino His Trap (5 mL) acoplada a un sistema FPLC y equilibrada previamente con Amortiguador A_{TEV} (NaCl 0.5 M, K_2HPO_4 0.05 M, DTT 0.3 M, Imidazol 0.02 M pH=7.5). La columna se lavó con 8 volúmenes de Amortiguador A_{TEV} , después la proteína se eluyó con Amortiguador B_{TEV} (NaCl 0.5 M, K_2HPO_4 0.05 M, DTT 0.3 M, Imidazol 0.5 M).

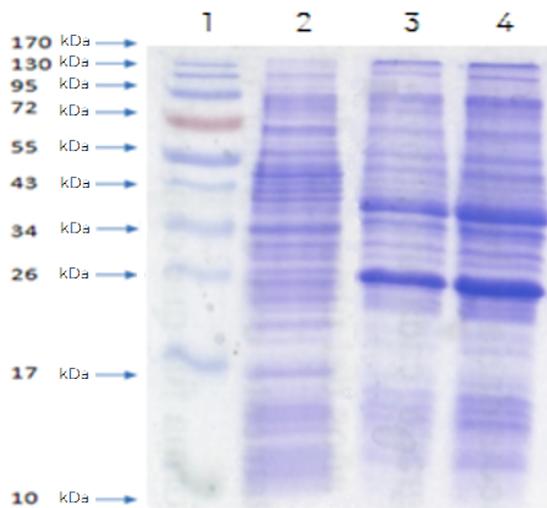


Figura 44. Pruebas de expresión para TEVp

Carriles:

- 1: Marcador de peso molecular (kDa)
- 2: Lisado celular antes de inducción
- 3 y 4: Autoinducción mediante Terrific Broth

Las fracciones que presentaron una señal de UV a 280 nm mayor a 200 mUA fueron colectadas y mediante SDS-PAGE se separaron las fracciones con la proteína de interés (**Figura 45**). Después de verificar el peso molecular buscado se concentraron para finalmente dializarla contra amortiguador Tris 50 mM, EDTA 0.5mM y DTT 1 mM a pH 8, se cuantificó la concentración de proteína mediante ensayo de BCA y posteriormente con este amortiguador se mezcló a una proporción 1:1 con glicerol estéril para filtrarse por 0.45 μ m y conservarse a -20 $^{\circ}$ C.

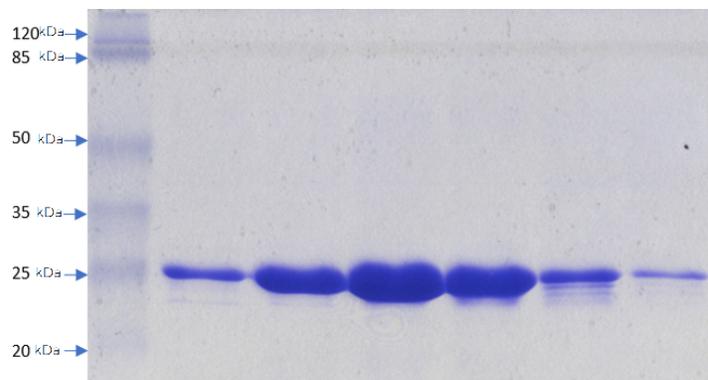


Figura 45. SDS-PAGE de las fracciones colectadas al momento de eluir la proteína de interés ~26 kDa, con la solución de alta concentración de imidazol.

A.8 PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN A 1.33 G CM⁻³ DE CLORURO DE CESIO PARA GRADIENTE CONTINUO

Se pesan 40.8 g de CsCl, y se solubilizan en 79.22 mL de la solución amortiguadora de gradiente (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, EDTA 10 mM, 0.5% v/v de Tritón X-100, pH 7.4). Los tubos de centrifuga tienen capacidad de 5 mL de solución (Ultra-Clear Beckman 11 x 60 mm). Se colocan 3.5 mL de la solución amortiguadora y posteriormente 500 µL de la solución que contiene a las VLPs.