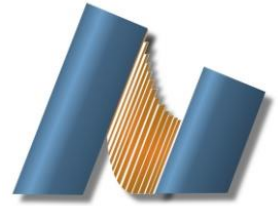




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA



LICENCIATURA EN NANOTECNOLOGÍA
BIONANOTECNOLOGÍA

**ESTUDIO DE LA PURIFICACIÓN Y ESTABILIDAD DE PARTÍCULAS PSEUDOVIRALES
DERIVADAS DEL BACTERIÓFAGO P22 CON ACTIVIDAD PEROXIGENASA DE CITOCROMO
P450**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN NANOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
JUAN MANUEL HERNÁNDEZ MEZA

DIRECTOR DE TESIS
DR. RAFAEL VÁZQUEZ DUHALT

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA NOVIEMBRE 2017



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.

Hago constar que el trabajo que presento es de mi autoría y que todas las ideas, citas textuales, datos, ilustraciones, gráficas, etc. sacados de cualquier obra o debidas al trabajo de terceros, han sido debidamente identificados y citados en el cuerpo del texto y en la bibliografía y acepto que en caso de no respetar lo anterior puedo ser sujeto de sanciones universitarias.

Afirmo que el material presentado no se encuentra protegido por derechos de autor y me hago responsable de cualquier reclamo relacionado con la violación de derechos de autor.

Juan Manuel Hernández Meza

<< A mis padres, por fomentar en mí el pensamiento crítico. >>

Agradecimientos

A mi asesor de tesis el Dr. Rafael Vázquez Duhalt por sus consejos y por aceptarme en el grupo de Bionanotecnología.

A mi comité sinodal, por tomarse el tiempo de revisar y leer mi trabajo.

A mi madre que me enseñó lo que es enfrentarse a los miedos, completar metas y desafíos.

A mi padre el “héroe máximo”, que me mostró lo que significa ser un profesional y competir.

A mi tía Rosario por siempre apoyarme en mi decisión de entrar a la UNAM.

A mi novia Yaneli Hipólito Vicente con quien compartí: momentos de dudas, problemas, cariños y chistes malos. Gracias por darme tu confianza y amor.

A mis profesores, aquellos que me inculcaron el interés por la ciencia: Diego Cesar Salinas Reyes, José Cosme Aguilar Bazán, Juan Hernández Delgado y Diana Lluís Arroyo. A quienes me guiaron, incentivando la libre discusión, durante mis estudios universitarios: Carlos Iván Ochoa y Javier Pérez Robles.

A Karla Paulina Alejo, por la excelente manera de transmitir su experiencia y su amistad.

A mis amigos por su apoyo: Omar Domínguez Flores, Manuel Alejandro Moreno González, José Iván Domínguez Avilés, Esteban Aceves Fonseca, Nashiely Fernández González, Karla Rivas, Laura Elibet Beltrán Peñaflor, Jorge Moctezuma Valdivia Chávez, Carlos Heraclio, Sofía Michaelian Martínez, Juan Carlos Otero Mondragón, Brian Becerril, Baldo Luis Nájera Santos, Alam Tonaltzin, Guillermo Drew Barragán, Iván Rosales Fuerte, Kendra Ramírez Acosta, Juan Eduardo Pérez y Paulina Tafoya.

Tabla de contenido

Resumen	8
Introducción	9
1. Enzimas	9
1.1. Biocatálisis: aplicaciones de las de enzimas	9
1.1.1. Medicina	10
2. Bacteriófago P22	11
3. Cápsides virales y partículas pseudovirales	12
3.1. Estabilidad de partículas pseudovirales	13
3.2. Partículas pseudovirales derivadas de la procápside del bacteriófago P22	13
3.2.1. Proteína de andamiaje de la cepa de P22 c1-7, 13 amH101 truncada (SP ₁₄₁₋₃₀₃)	15
4. Bionanorretores y metabolones.....	15
4.1. Bionanorretractor con actividad peroxigenasa	16
4.1.1. Variante HF87A del citocromo P450 _{BM-3} 21B3	16
4.1.2. Bionanorretractor P22 CYP _{BM3} 21B3 _{heme} -SP	16
Hipótesis	17
Objetivo general.....	17
Objetivos específicos.....	17
Materiales y métodos	18
1. Expresión diferencial citocromo HF87A P450 _{BM-3} 21B3-SP ₁₄₁₋₃₀₃ y proteína de capa P22	18
2. Extracción y purificación de VLPs	19
3. Fuerza iónica.....	21
3.1. Cálculo del pH con corrección de Debye-Hückel.....	23
4. Dispersión dinámica de luz / espectroscopia de correlación de fotones.....	24
4.1. Caracterización por dispersión dinámica de luz.....	27
Resultados.....	30
1. Niveles de expresión del esquema de inducción	30
2. Purificación de VLPs	31
3. Determinación de la estabilidad estructural de los bionanorretores por dispersión dinámica de luz	37
Conclusiones y perspectivas.....	43
Referencias.....	44
Apéndice	47

1. Gráficas de intensidad de las mediciones de dispersión dinámica de luz	47
2. Código utilizado para el análisis de varianza (ANOVA) de un sentido en el software MATLAB R2017a	54

Resumen

Se realizó la expresión y purificación de nanoestructuras proteicas derivadas del virus P22 (VLPs) con el dominio hemo del citocromo P450 CYP_{BM-3} 21B3 encapsulado. Los pasos de expresión y purificación fueron estudiados con técnicas de electroforesis en gel, espectrofotometría de UV-visible y cromatografía de exclusión molecular. Se encontró que el confinamiento de citocromo P450 entre distintos lotes es susceptible a cambios relacionados con las condiciones de cultivo. Después se realizó un estudio de la estabilidad de las VLPs ante distintas condiciones de pH y fuerza iónica, en el cual se encontró que el ensamblaje es estable en el intervalo de pH de 4 a 9 durante al menos una hora. Estos resultados implican un aumento en las potenciales aplicaciones de los sistemas basados en la VLP de P22.

Introducción

A finales del siglo XX el enorme avance de la física, química y biología llevó a la creación de nuevos campos multidisciplinarios como la Nanociencia. La nanociencia tiene como objeto de estudio todos los sistemas que involucren al menos una dimensión con un tamaño menor a 100 nm, puesto que dentro de esa escala un mismo material puede presentar propiedades físicas diferentes que a escalas macroscópicas. Por otra parte, la nanotecnología busca utilizar los conceptos de la nanociencia para crear y aplicar nuevos materiales y dispositivos (Mehta, 2016). La rama de la bionanotecnología utiliza las moléculas biológicas, los conceptos del funcionamiento de sistemas biológicos y en general la biotecnología para crear o mejorar materiales o dispositivos (Nagamune, 2017). En este trabajo, enfocado en la bionanotecnología, se analizó la estabilidad de contenedores proteicos de tamaño nanométrico con actividad peroxigenasa.

1. Enzimas

Las enzimas son catalizadores nanométricos de origen biológico, su actividad es indispensable para que las reacciones químicas que sustentan la vida de un organismo tengan lugar en un tiempo útil. Se distinguen de otros catalizadores principalmente por su estructura que está constituida por al menos una cadena polimérica de aminoácidos o ribonucleótidos (ribozimas) (Cornish-Bowden, 1995). Las enzimas al ser macromoléculas de origen biológico han estado sujetas al proceso evolutivo y como resultado hoy en día existe una gran variedad que cataliza eficientemente distintas reacciones y con un alto grado de selectividad por los reactantes o sustratos (Cech & Bass, 1986). La nomenclatura utilizada para clasificar enzimas de acuerdo al tipo de reacción química que catalizan es el número de la comisión enzimática o número EC (por sus siglas en inglés *Enzyme Commission*), de acuerdo a este sistema existen 6 clases de enzimas: I) oxidorreductasas (EC 1), II) transferasas (EC 2), III) hidrolasas (EC 3), IV) liasas (EC 4), V) isomerasas (EC 5) y VI) ligasas (EC 6) (Tipton & Boyce, 2000).

1.1. Biocatálisis: aplicaciones de las de enzimas

La biocatálisis utiliza las enzimas o microorganismos para sintetizar sustancias químicas con valor económico, y actualmente se usa comúnmente la modificación de enzimas por técnicas de biología molecular, ya sea por mutaciones sitio-dirigidas o por evolución dirigida. Las enzimas pueden diseñarse para cumplir con especificaciones requeridas en un proceso como son: estabilidad a temperaturas cercanas a 60 °C, estabilidad en soluciones con solventes orgánicos, capacidad de aceptar nuevos sustratos y catalizar reacciones ajenas a enzimas tipo silvestre (Bornscheuer et al., 2012). En 2014 se estimó el valor del mercado global anual de las enzimas a nivel industrial en 4.2 mil millones de dólares y se espera que durante el periodo de 2015 a 2020 aumente la cifra hasta superar los 6 mil millones de dólares anuales (Singh, Kumar, Mittal, & Mehta, 2016).

El conocimiento sobre el funcionamiento enzimático ha permitido mejorar la producción de bienes; tales como derivados lácteos, bebidas, detergentes y polímeros. Por otra parte, los campos de la medicina y la química fina destacan por proponer la utilización de sistemas enzimáticos para obtener moléculas específicas en regiones específicas del cuerpo o cuya síntesis es difícil de regular.

1.1.1. Medicina

Se considera que el uso de proteínas como agentes terapéuticos inició en 1922 con el trabajo de Banting y Fest. Ellos introdujeron el uso de la hormona insulina extraída de bovinos y porcinos para el tratamiento de la diabetes *mellitus* tipo I. Sin embargo, fue hasta 1982 cuando se aprobó el uso de la insulina producida de manera recombinante por la bacteria *Escherichia coli*. Lo que significó una reducción en los costos de producción de la hormona, además de una disminución del número de reacciones adversas intrínsecas a un xenotransplante. Este suceso consolidó la tecnología del ADN recombinante como una de las más prometedoras para diseñar nuevas terapias, desde entonces se ha expandido el uso de proteínas en el área de la medicina (Banting et al., 1922).

A mediados del año 2017 la Administración de Alimentos y Medicamentos o FDA (por sus siglas en inglés, *Food and Drug Administration*) había aprobado un total de 239 proteínas y péptidos para uso terapéutico. Las enzimas terapéuticas son utilizadas comúnmente para reemplazar o sustituir la actividad de enzimas endógenas deficientes, también se ha aprovechado la actividad de diversas enzimas para acelerar procesos de degradación de macromoléculas y metabolitos que dificultan o complican la recuperación de un paciente (Lagasse et al., 2017; Leader, Baca, & Golan, 2008; Usmani et al., 2017).

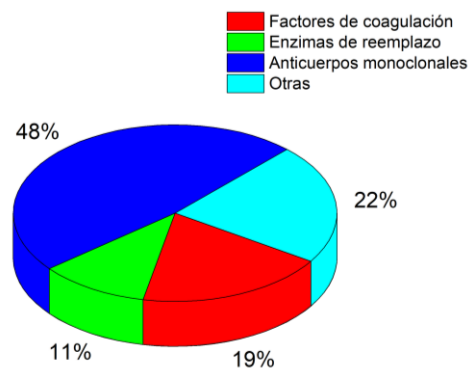


Figura 1. Proteínas terapéuticas aprobadas por la FDA en el periodo de 2011 a 2016. Otras incluye: proteínas de fusión, hormonas, factores de crecimiento y proteínas de plasma. Imagen modificada de Lagassé et al. (2017).

2. Bacteriófago P22

El bacteriófago P22 es un fago templado que almacena su información genética en forma de ADN de doble cadena, típicamente completa su ciclo en *Salmonella typhimurium* (Jonathan King, Hall, & Casjens, 1978). El proceso de maduración de este virus requiere el ensamble de una procápside que contiene múltiples proteínas y que carece de ADN, posteriormente con la expulsión de las proteínas de andamiaje se lleva a cabo el empaquetamiento del ADN y se completa la maduración a cápside de virión, ver Figura 2. El virión cuenta con una cola corta no contráctil (Molineux, 2001) que se une a secuencias específicas de polisacáridos de membrana, después ocurre la inyección del ADN viral al interior de la célula y el bulto proteico de virión permanece en el ambiente extracelular (Fields, Knipe, & Howley, 2013).

La formación de la procápside necesita de 250-300 copias de proteína de andamiaje producto del gen 8 o gp8 (por sus siglas en inglés *gene product*), contiene 415 copias de la proteína de capa (gp5), 12-20 copias de tres proteínas de eyección (gp7, gp16, gp20) y el complejo de proteína portal compuesto por 12 copias (gp1) (Chen et al., 2011; Parent et al., 2010).

La proteína de andamiaje SP (*por sus siglas en inglés Scaffolding Protein*) es un catalizador esencial para la correcta formación de procápsides con simetría icosaédrica y número de subunidades en la unidad asimétrica (número de triangulación) T=7 (Fuller & King, 1982). Múltiples copias de SP interactúan con el complejo de proteína portal generando un centro de nucleación para la posterior adición asistida de más copias de proteína de capa o CP (*por sus siglas en inglés Coat Protein*), las CP cuentan con dos sitios de unión negativos (brazo N y dominio A) al extremo positivo C-terminal de la SP (Chen et al., 2011), la ausencia total de esta interacción electrostática evita la incorporación del complejo portal, las proteínas piloto y ralentiza el ensamble de la CP presentándose a su vez la formación de estructuras pseudoprocápsides ($\varnothing=58$ nm), pseudoprocápsides expandidas, pseudoprocápsides pequeñas con T=4 ($\varnothing < 48$ nm) y estructuras aberrantes en formas de espiral (Thuman-Commike, Greene, Malinski, King, & Chiu, 1998).

La proteína de andamiaje tipo silvestre forma monómeros, dímeros y tetrámeros en solución que participan durante el ensamble de las procápsides (Parker, Stafford, & Prevelige, 1997). La posterior expulsión de la proteína de andamiaje, proceso asociado al empaquetamiento del ADN viral, permite la reutilización de las proteínas de andamiaje hasta siete veces (J. King & Casjens, 1974), y se ha interpretado como un interruptor conformacional que desencadena modificaciones en la estructura tridimensional de la CP para formar la cápside madura de virión ($\varnothing= 64$ nm), ver Figura 2. Se sabe que el dominio conformado por los residuos 1-74 a partir del N-terminal de la SP tiene la capacidad de autorregular negativamente la expresión en un paso postranscripcional (Sun et al., 2000).

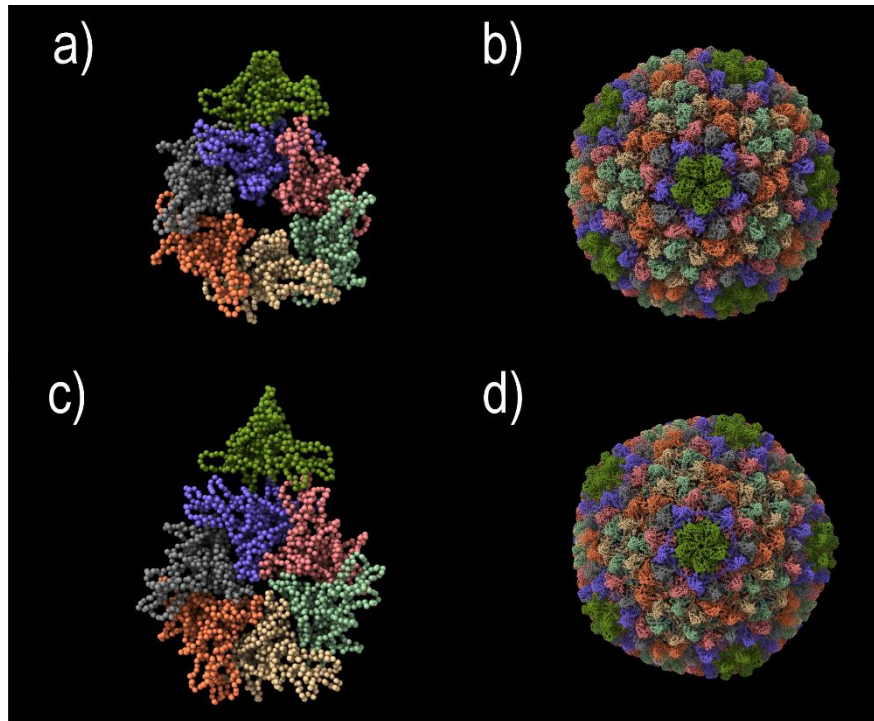


Figura 2. Estructuras de cápside de bacteriófago P22: a) unidad asimétrica de la procápside (PDB ID: 2XYY), b) procápside ensamblada solo se muestran proteínas de capa, c) unidad asimétrica de cápside de virión (PDB ID: 2XYZ), d) cápside de virión solo se muestran proteínas de capa. UCSF ChimeraX versión 0.1.

3. Cápsides virales y partículas pseudovirales

Las cápsides icosaédricas son estructuras con dimensiones de alrededor de 22 a 150 nm, ensambladas a partir de la unión de subunidades proteicas llamadas capsómeros. Los capsómeros a su vez son multímeros conformados por otros monómeros proteicos (Grgacic & Anderson, 2006; Zandi, Reguera, Bruinsma, Gelbart, & Rudnick, 2004).

Las partículas pseudovirales, partículas similares a virus, o VLPs (por sus siglas en inglés *Virus Like Particles*) se derivan de la cápside de un virus. Sin embargo, las VLPs no presentan la capacidad de replicarse ya que carecen de ácidos nucleicos que codifiquen las proteínas de sus capsómeros. En el área de la biotecnología se han destacado las siguientes propiedades de las VLPs:

- Capacidad para ensamblarse espontáneamente, o autoensamblarse, en ciertas condiciones de fuerza iónica, presión osmótica, temperatura y pH (Bancroft, Hills, & Markham, 1967).
- Propiedades inmunogénicas (Grgacic & Anderson, 2006).
- Capacidad de contener moléculas de interés como fármacos, ácidos nucleicos, péptidos e incluso proteínas. Al ser estructuras huecas pueden contener diferentes cargos (Flenniken et al., 2009).

- Los grupos reactivos presentes en la superficie de la VLP pueden ser usados para unir moléculas funcionales (Zeltins, 2013), o alternativamente se pueden añadir residuos reactivos en sitios convenientes (Kang et al., 2010).

3.1. Estabilidad de partículas pseudovirales

La estabilidad de las partículas pseudovirales ante diferentes condiciones es dependiente del proceso evolutivo del virión del que se derivan. Por ejemplo, las cápsides de virión que se internalizan en una célula para iniciar su ciclo infeccioso deben ser capaces de responder a estímulos de pH y fuerza iónica propios del interior de la célula hospedera para liberar su material genético e iniciar su ciclo de multiplicación. *In vitro*, las nanopartículas virales derivadas reproducen el proceso de desensamble cuando son incubadas a valores específicos de pH y fuerza iónica (Tang et al., 2009). Otras estrategias evolutivas propias de los virus deben de considerarse, como el uso de una membrana lipídica para recubrir la cápside, la asociación y/o interacción electrostática de proteínas de la cápside con los ácidos nucleicos, así como el tipo de unión que presentan los capsómeros que puede ser covalente, por interacciones hidrofóbicas, etc. (Dika, Duval, Ly-Chatain, Merlin, & Gantzer, 2011; Katen & Zlotnick, 2009; Mertens & Velev, 2015)

Es importante enfatizar que las partículas pseudovirales no necesariamente conservan las propiedades físicas de las nucleocápsides de las cuales se derivan, ya que al carecer de los ácidos nucleicos (moléculas altamente cargadas) la estabilidad de la cápside se deberá principalmente a las interacciones entre capsómeros y proteínas asociadas a la estructura, además la VLP puede estar constituida por un conjunto de proteínas distinto al de la cápside silvestre. Una VLP puede tener distinta movilidad electroforética, y estabilidad estructural (morfología) ante cambios de pH y fuerza iónica con respecto a la nucleocápside o cápside del virus silvestre (Dika et al., 2011; Katen & Zlotnick, 2009; Lepault et al., 2001).

3.2. Partículas pseudovirales derivadas de la procápside del bacteriófago P22

Para obtener la VLP derivada del P22 es suficiente la presencia de proteína de capa (CP) y la proteína de andamiaje (SP). Esta estructura pseudoprocápside tiene un diámetro de 58 nm al igual que la procápside del fago silvestre, sin embargo si se incuba a 65 °C durante 10 minutos la estructura se transforma de manera irreversible a la forma expandida de la cápside (EX), con un diámetro de 64 nm, la partícula resultante es de diámetro similar a la cápside madura del P22. El cambio de diámetro

de 6 nm significa un incremento con respecto al volumen efectivo inicial de la cavidad interna (58,000 nm³) del 49% (Dustin P. Patterson, Schwarz, et al., 2012).

Por otra parte una incubación prolongada durante al menos 20 min a 75 °C ocasiona que la estructura EX libere de manera selectiva subunidades de los vértices con simetría pentagonal (*5-fold*) dando como resultado una VLP con huecos de 10 nm, esta partícula “ultraliviana” se conoce de manera informal como *Wiffle Ball* (WB) (Kang et al., 2010).

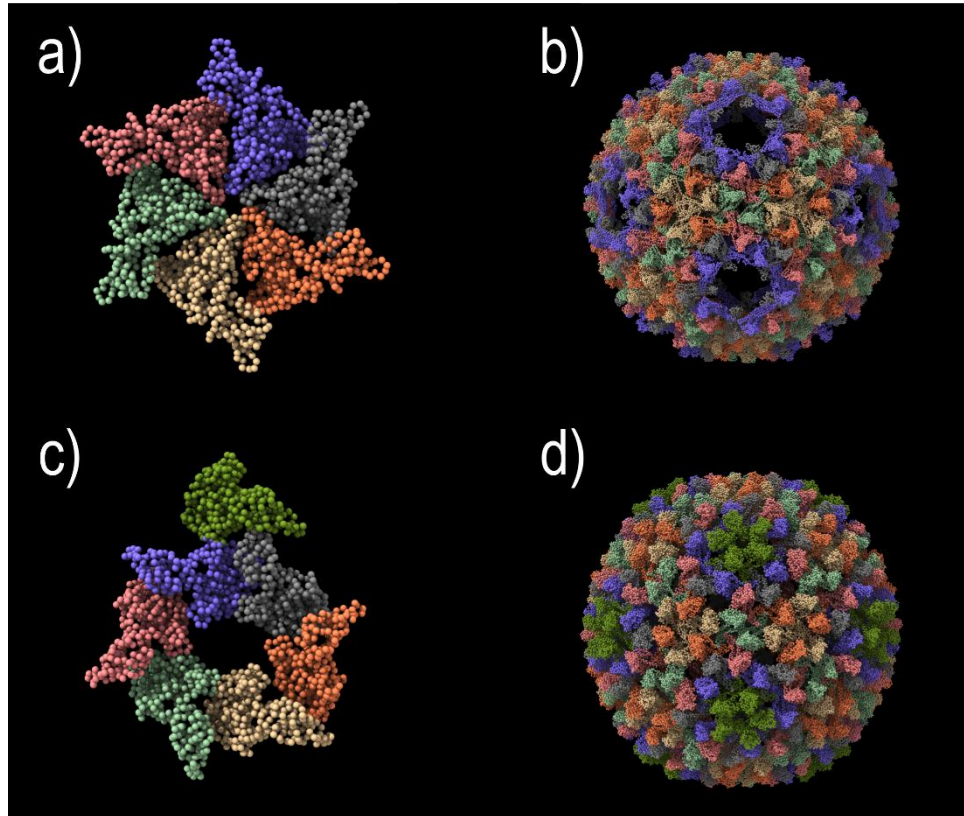


Figura 3. Estructuras de cápside de bacteriófago P22 obtenidas *in vitro*: a) unidad asimétrica de la procápside ultraliviana (PDB ID: 3IYH), b) procápside ultraliviana (WB) solo se muestran proteínas de capa., c) unidad asimétrica de procápside expandida (PDB ID: 3IYI), d) procápside expandida (EX) solo se muestran proteínas de capa. UCSF ChimeraX versión 0.1.

3.2.1. Proteína de andamiaje de la cepa de P22 c1-7, 13⁻ amH101 truncada (SP₁₄₁₋₃₀₃)

La proteína de andamiaje o SP contiene 303 aminoácidos. En la cepa de P22 c1 – 7, 13⁻ amH101 contiene una mutación con respecto a la tipo silvestre la cual sustituye el residuo 259 de prolina por un residuo de histidina. Parker y colaboradores (1997) clonaron y expresaron un segmento truncado de esta proteína SP, el dominio SP₁₄₁₋₃₀₃ que conserva 163 residuos del extremo carboxilo terminal, con un peso molecular de 18 kDa y que es capaz de dirigir el ensamblaje de la proteína de capa para formar partículas del tamaño de una procápside (partículas pseudoprocápside). A diferencia de la SP silvestre la variante SP₁₄₁₋₃₀₃ no se asocia para formar tetrámeros y tampoco posee la capacidad de modular su propia síntesis *in vivo* y por lo tanto es posible inducir su sobreexpresión (Parker, Jablonsky, et al., 1997).

El ensamblaje de las estructuras pseudoprocápside (a partir de ahora se identificarán como partículas pseudovirales) es altamente influido por la concentración de proteína SP₁₄₁₋₃₀₃ con respecto a la proteína de capa, ya que tanto una baja concentración de SP₁₄₁₋₃₀₃ como una alta concentración con respecto a la proteína de capa propicia la formación de estructuras aberrantes con forma de espiral. *In vitro*, el porcentaje de ensamble de partículas aberrantes varía de 46 % a 8 % mientras que la variante silvestre mantiene un porcentaje de 2 % a diferentes concentraciones de SP (Parker, Casjens, & Prevelige, 1998).

4. Bionanorreactores y metabolones

Como se ha descrito previamente uno de los grandes problemas de la utilización de enzimas es su relativamente corto tiempo de actividad o estabilidad ante condiciones de operación no ideales de temperatura, pH, e incluso por interacción con sustratos análogos u otros agentes. Una de las tantas estrategias que busca solventar los problemas relacionados al tiempo de vida de una enzima es su encapsulación dentro de partículas pseudovirales (Dustin P. Patterson, Schwarz, et al., 2012).

La encapsulación en VLPs se ha llevado a cabo *in vitro* mediante ciclos de ensamble y desensamble en presencia de las enzimas de interés. Por otro lado, *in vivo* se puede diseñar una modificación genética que propicie la localización de la enzima adentro de la VLP (Fiedler, Brown, Lau, & Finn, 2010). A la construcción que involucra el encapsulamiento de una enzima por una VLP, dando como resultado una partícula pseudoviral con actividad catalítica se le puede denominar bionanorreactor.

La partícula pseudoviral de P22 es propuesta como un sistema con gran potencial para desarrollar bionanorreactores (Dustin P. Patterson, Prevelige, & Douglas, 2012). A la fecha el bionanorreactor más complejo consiste en una cascada enzimática de tres reacciones acopladas que emula los compartimientos en los cuales suceden rutas metabólicas, a este sistema sintético se le denominó metabolón (D. P. Patterson, Schwarz, Waters, Gedeon, & Douglas, 2014). La estrategia para lograr el ensamble involucró una expresión concomitante de la proteína CP, y la proteína SP fusionada a las tres enzimas de interés. Los resultados de ese trabajo podrían ser de especial interés para áreas como la química fina que requieren la síntesis de productos de altamente específicos.

4.1. Bionanorreactor con actividad peroxigenasa

4.1.1. Variante HF87A del citocromo P450_{BM-3}21B3

Cirino y Arnold (2002) realizaron evolución dirigida de la enzima citocromo P450 de *Bacillus megaterium* (EC 1.14.14.1) por mutagénesis aleatoria y lograron obtener una variante F87A con actividad peroxigenasa incrementada. El incremento en la eficiencia del uso de peróxido de hidrógeno como sustrato en la oxidación de diferentes compuestos hizo innecesario el dominio reductasa para catalizar eficientemente la monooxigenación, por lo que se escindió el dominio reductasa de la cadena polipeptídica, la variante con únicamente el dominio hemo (sitio catalítico) se denominó HF87A y resultó ser más termoestable que la enzima completa. Por otra parte, la variante HF87A 21B3 cuenta con nueve sustituciones aminoacídicas adicionales a la variante HF87A y tiene una actividad catalítica 15 veces mayor. Además, se reportó que los productos de las reacciones catalizadas con peróxido de hidrógeno en las variantes de HF87A eran similares a los productos de reacciones catalizadas por la enzima sin mutación y con el dominio reductasa (Cirino, 2004; Cirino & Arnold, 2002). En este trabajo se identificará la variante HF87A de citocromo P450_{BM-3} 21B3 como CYP_{BM3} 21B3_{heme}.

4.1.2. Bionanorreactor P22 CYP_{BM3} 21B3_{heme}-SP

Sánchez-Sánchez (2014) reportó en su trabajo doctoral la encapsulación exitosa de varias moléculas de CYP_{BM3} 21B3_{heme} activas (~38-55) dentro de partículas pseudovirales de P22, la estrategia consistió en aprovechar el ensamble espontáneo de la CP y la proteína SP₁₄₁₋₃₀₃ fusionada por el extremo amino terminal a la enzima. El bionanorreactor (P22 CYP_{BM3} 21B3_{heme}-SP) ha resultado ser un modelo para diseñar nuevas terapias médicas basadas en el transporte de actividad enzimática (Sanchez-Sanchez et al., 2015).

Hipótesis

La estructura del bionanorreactor P22 CYP_{BM3} 21B_{3heme}-SP conservará un alto grado de estabilidad ante diferentes condiciones de pH y fuerza iónica ya que la cápside silvestre del bacteriófago P22 de la cual se deriva, no efectúa en su ciclo de infección un proceso de desensamble o internalización y no se ha reportado la necesidad de moléculas cargadas como ácidos nucleicos para la estabilización de la cápside.

Objetivo general

Determinar el efecto del pH y la fuerza iónica del medio en la estabilidad estructural de las nanopartículas biocatalíticas P22 CYP_{BM3} 21B_{3heme}-SP.

Objetivos específicos

- Producir cantidades suficientes del bionanorreactor P22 CYP_{BM3} 21B_{3heme}-SP.
- Estudiar el intervalo de estabilidad del bionanorreactor P22 CYP_{BM3} 21B_{3heme}-SP en condiciones de pH y fuerza iónica utilizando la técnica de dispersión dinámica de luz.
- Determinar el punto isoeléctrico del bionanorreactor P22 CYP_{BM3} 21B_{3heme}-SP.

Materiales y métodos

- pBAD CYP-SP (plásmido que confiere resistencia a ampicilina, promotor araBAD inducible por arabinosa, contiene el gen que codifica para el citocromo P450_{BM-3} 21B3_{heme} fusionado a la proteína SP₁₄₁₋₃₀₃ una variante truncada de la proteína de andamiaje del bacteriófago P22). Suministrado por la Dra. Lorena Sánchez quien lo clonó y lo expresó previamente.
- pRSF CP P22 (plásmido que confiere resistencia a kanamicina, promotor T7 inducible por IPTG, codifica para el producto del gen 8 del bacteriófago P22 denominado proteína de capa). Suministrado por el Dr. Trevor Douglas, *Indiana University*.
- Se utilizó la cepa de *Escherichia coli* BL21 DE3 pLysS (En el ADN cromosomal contiene el lisógeno DE3 que lleva el gen de la T7 ARN polimerasa controlado por el promotor lacUV5, que es inducible por IPTG. Además, contiene el plásmido pLysS que confiere resistencia a la kanamicina, así como el gen que codifica para la lisozima T7, un inhibidor de la T7 ARN polimerasa). Suministrado por la M. en C. Viviana Cabanillas, Unidad de Desarrollo Biomédico CICESE.

1. Expresión diferencial citocromo HF87A P450 BM-3 21B3-SP₁₄₁₋₃₀₃ y proteína de capa P22

A partir de una clona transformada con los plásmidos pBAD CYP-SP y pRSF CP P22 se preparó un preinóculo en 5 ml de medio TB (del inglés *Terrific Broth*) con 200 µl/mg de ampicilina, 50 µl/mg de sulfato de kanamicina y 34 µl/mg de cloranfenicol durante 12 horas. En matraces Erlenmeyer de 250 ml de boca ancha se añadieron 50 ml de medio TB con 200 µl/mg de ampicilina, 50 µl/mg de sulfato de kanamicina, 34 µl/mg de cloranfenicol, suplementado con 0.5 mM de clorhidrato de tiamina y 250 µl de solución de metales traza compuesta de 5 M HCl, 36 mM FeSO₄ · 7H₂O, 18 mM CaCl₂, 7.7 mM ZnSO₄ · 7H₂O, 2.2 mM MnSO₄ · 4H₂O, 4.0 mM CuSO₄ · 5H₂O, 0.08 mM (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O y 0.05mM Na₂B₄O₇ · 10H₂O de acuerdo a la preparación de Ahn, Park, and Lee (2000), finalmente se adicionaron 50 µl de preinóculo a cada matraz con medio TB.

Los matraces inoculados se dejaron en incubación siete horas a 35 °C a 150 rpm. Posteriormente, se sacaron los matraces de la incubación para agregar el inductor L-arabinosa a una concentración de 0.125 % (w/v) y 1 mM δ-clorhidrato de ácido aminolevulínico, después los matraces se incubaron durante 16 horas a 30 °C a 120 rpm. Se volvió a detener la incubación para adicionar el inductor IPTG hasta una concentración final de 0.3 mM y se devolvieron los matraces a incubación durante tres horas a 30 °C a 150 rpm. De acuerdo al esquema de la Figura 3 se tomaron 30 µl de cultivo antes de las inducciones con L-arabinosa, IPTG y al final de la incubación para cuantificar la densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) en un espectrofotómetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific Inc., USA) en el modo pedestal. Finalmente, se centrifugaron en frío los cultivos a 3,840 × g por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se almacenó el sedimento a -80 °C.

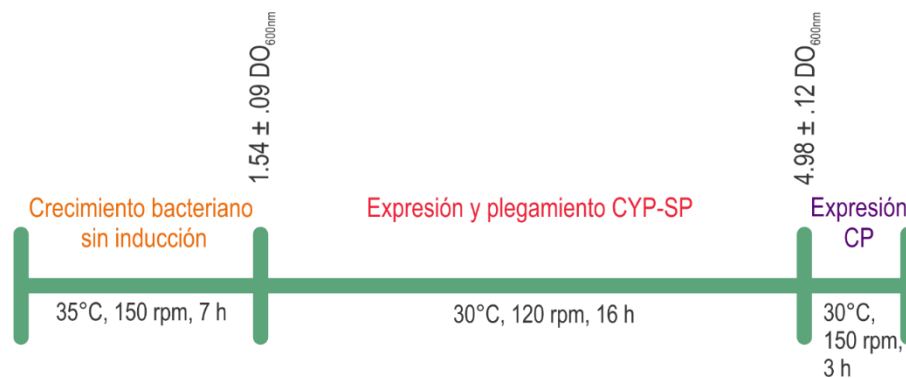


Figura 3. Esquema de inducción para el ensamble in vivo de VLPs con actividad citocromo P450 en *E.coli*. Las densidades ópticas mostradas corresponden al lote I.

2. Extracción y purificación de VLPs

Se resuspendió el sedimento bacteriano en amortiguador de lisis (~150 ml/l de cultivo) preparado el mismo día con 50 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaCl y ajustado a pH 7.6 con HCl. Para lisar las células se sometió la muestra a sonicación con un procesador ultrasónico Vibra cell VCX750 (Sonics & Materials). La sonicación se realizó a una amplitud de 37% en 10 ciclos de nueve segundos de pulso alternados con nueve segundos de descanso, para dar un total de 63 segundos de pulsos por ciclo o siete pulsos por ciclo. La energía administrada por ciclo fue de ~1,340 J. Una vez lisadas las células se sometió la muestra a centrifugación a 12,000 × *g* durante 30 minutos a 4 °C y se conservó el sobrenadante.

Para realizar la ultracentrifugación previamente se prepararon los tubos de policarbonato de pared gruesa enjuagándolos con agua desionizada esterilizada por autoclave (H₂Od), después se llenaron con una solución de peróxido de hidrógeno al 10 % (v/v) en H₂Od y se dejó reposar durante 10 minutos, posteriormente se volvieron a enjuagar los tubos con H₂Od. Además, se preparó una solución de sacarosa al 35% (w/v) en amortiguador PBS pH 7 compuesto por 50 mM Na₂HPO₄, 34 mM NaH₂PO₄, 25 mM NaCl. La solución de sacarosa se esterilizó por filtración en membrana de nitrocelulosa con diámetro de poro de 0.22 μm.

Se utilizó un volumen aproximado de 5 ml de colchón de sacarosa por cada tubo de policarbonato. Las muestras se ultracentrifugaron a 30,000 rpm durante 1 hora y 48 minutos a 9°C en el rotor de columpio SW 32 Ti Beckman Coulter, Inc. (Optima XPN-100 Ultracentrifuge, Beckman Coulter). Después, se eliminó el sobrenadante y se adicionó un volumen de ~1.5 ml de amortiguador PBS a cada tubo, posteriormente los tubos se taparon con Parafilm y se sometieron a agitación constante (~220 rpm) a 4 °C durante más de 12 horas. Se procedió a complementar la resuspensión del sedimento con 5 minutos de pipeteo suave y procurando no formar burbujas. Se transfirió el contenido de los tubos a un solo recipiente y se centrifugó a $12,000 \times g$ durante 15 minutos a 4 °C para remover agregados.

Para realizar la cromatografía de exclusión molecular se hizo pasar el sobrenadante por un filtro con tamaño de poro de 0.22 μm de nitrocelulosa. Luego, se inyectó un volumen menor a 5 ml de la solución filtrada en la columna HiPrep 16/60 Sephacryl S-500 HR (GE Healthcare). Con el equipo ÄKTA prime plus (GE Healthcare) se estableció un flujo de 1 ml/min de amortiguador PBS pH 7 y se monitoreó la absorbancia a 280 nm de la fase móvil durante al menos 100 minutos. Las fracciones de la fase móvil correspondientes a las VLPs correctamente ensambladas (con un tiempo de retención de 69.8 ± 3.7 min) se recolectaron y se concentraron por medio de ultracentrifugación sin colchón de sacarosa a 30,000 rpm durante 1 hora y 48 minutos a 9 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento de VLPs en 100 mM Tris-HCl pH 8 con agitación leve y constante a 4 °C. Las VLPs resuspendidas se almacenaron a -80 °C.

En este trabajo los cultivos se realizaron en tres lotes de matraces Erlenmeyer de boca ancha de 250 ml, las condiciones de cultivo fueron las siguientes:

- Lote I: es el resultado del protocolo previamente descrito.
- Lote II: compuesto por 11 matraces (570 ml de medio de cultivo), en 10 de los cuales se utilizó un volumen de 50 ml de medio de cultivo, en el restante se utilizó un volumen de 70 ml de medio. Uno de los matraces con 50 ml se creció con 50% más L-arabinosa, es decir, la concentración final fue de 0.1875% (w/v).
- Lote III: con variaciones de temperatura, se creció el inóculo a ~36 °C durante 7 horas y la temperatura en la cual se llevó a cabo la expresión y plegamiento de la CYP-SP fue ~33°C.

3. Fuerza iónica

La fuerza iónica es una función que describe la concentración efectiva de iones que apantalla interacciones de macromoléculas, depende de la molaridad (m_i) y de la carga de cada especie iónica (z_i) (Liu, Poolman, & Boersma, 2017).

$$I = \frac{1}{2} \sum_i m_i z_i^2 \quad (1)$$

Fue introducida por Lewis y Randall (1921) para describir coeficientes de actividad de diferentes disoluciones salinas complejas y diluidas. Establecen como principio general que en soluciones diluidas el coeficiente de actividad de un electrolito fuerte dado es el mismo en todas las soluciones de la misma fuerza iónica. Ellos justifican su uso debido a la concordancia con los coeficientes de actividad de diferentes resultados experimentales. Definen la fuerza iónica (μ) como:

$$\mu = \frac{1}{2} \sum_i m_i z_i^2 \quad (2)$$

donde m_i es la molalidad de cada especie iónica y z_i su carga (Lewis & Randall, 1921).

Por otra parte el término de fuerza iónica surge del tratamiento matemático de la teoría de Debye-Hückel de 1923 (Sastre de Vicente, 2004), en ella se introduce el concepto de densidad local de carga ρ en la proximidad de un ión en solución:

$$\rho = e \sum_i c_i z_i \quad (3)$$

donde e es la carga del electrón y c_i es la concentración molar local del ion i .

La concentración molar local de un ion está relacionada al valor de concentración del bulto c_i^* por la ecuación:

$$c_i = c_i^* \exp\left(-\frac{z_i e \psi}{kT}\right) \quad (4)$$

donde ψ es el potencial eléctrico que actúa en i , T es la temperatura y k es la constante de Boltzmann.

Al sustituir la ecuación 4 en la ecuación 3 y expandir el factor exponencial en una serie de Taylor en 0 (serie de Maclaurin) se tiene:

$$\rho = e \sum_i c_i^* z_i \left(1 - \frac{z_i e \psi}{1! kT} + \frac{z_i^2 e^2 \psi^2}{2! k^2 T^2} - \frac{z_i^3 e^3 \psi^3}{3! k^3 T^3} + \dots \right) \quad (5)$$

A una temperatura T y presión P dadas en un solvente, ρ es proporcional a las funciones:

$$\rho = a_1 \sum_i c_i^* z_i + a_2 \sum_i c_i^* z_i^2 + a_3 \sum_i c_i^* z_i^3 + a_4 \sum_i c_i^* z_i^4 + \dots \quad (6)$$

donde $a_1 = e$, $a_2 = -\frac{e\psi}{kT}$, $a_3 = \left(-\frac{e\psi}{kT}\right)^2$, $a_4 = \left(-\frac{e\psi}{kT}\right)^3$ y así sucesivamente.

Considerando la condición de electroneutralidad de una disolución ($\sum_i c_i^* z_i = 0$) el primer término de la ecuación (6) es cero, el segundo término es proporcional a la fuerza iónica expresada en concentración molar y es el único usado para el computo de la densidad de carga local (Sastre de Vicente, 2004).

3.1. Cálculo del pH con corrección de Debye-Hückel

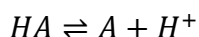
El valor de la constante de disociación ácida K_a es dependiente de la fuerza iónica I de la solución, así como el diámetro promedio de los iones. Ambos factores son considerados por la ecuación simplificada de Debye-Hückel (a 25 °C) válida para soluciones diluidas (Scopes, 1994):

$$8) pK_a = pK_a^0 + \frac{0.51nI^{1/2}}{1 + 1.6I^{1/2}}$$

Donde pK_a^0 es el pK_a extrapolado a fuerza iónica cero y $n = 2z - 1$, donde z es la carga en la forma ácida de la molécula amortiguadora. El resultado de la ecuación 8 se puede expresar de la siguiente manera:

$$9) K_a = 10^{-pK_a}$$

En el equilibrio se tiene una reacción ácido base de la siguiente forma:



Donde HA es el ácido y A la base conjugada, la Tabla I presenta las concentraciones de las especies químicas en diferentes instantes:

Tabla I. Concentraciones de las especies químicas en un instante

[HA]	[A]	[H ⁺]	
y	b	0	(Estado inicial)
-x	+x	+x	(Cambio)
y - x	b + x	x	(Equilibrio)

La constante de disociación ácida en el equilibrio puede ser definida como:

$$10) K_a = \frac{(b+x)x}{y-x} = \frac{x^2 + xb}{y-x}$$

Ordenando la ecuación se tiene:

$$11) x^2 + xb + xK_a - yK_a = 0$$

Resolviendo para obtener el valor de x :

$$12) x = \frac{-(b + K_a) \pm \sqrt{(b + K_a)^2 - 4(-yK_a)}}{2} = [H^+]$$

Se considera solo la raíz positiva, ya que x es una concentración molar y no puede tener valores negativos. Finalmente para soluciones diluidas se tiene:

$$pH = -\log[a_H^+] \approx -\log[H^+]$$

4. Dispersión dinámica de luz / espectroscopia de correlación de fotones

La dispersión dinámica de luz DLS (*por sus siglas en inglés Dinamic Light Scatering*) se basa en iluminar partículas pequeñas con un láser, una fuente de luz monocromática y colimada, con la consecuencia de que las partículas dispersan la luz en todas las direcciones (ver Figura 4), las ondas de luz dispersada interactúan, se solapan y generan interferencia. Al colocar un detector o pantalla en el cual se hace incidir la luz dispersada se observa un patrón de interferencia moteado con áreas brillantes y oscuras. Las áreas brillantes son causadas por una interferencia constructiva, mientras que las áreas oscuras son el resultado de una interferencia destructiva.

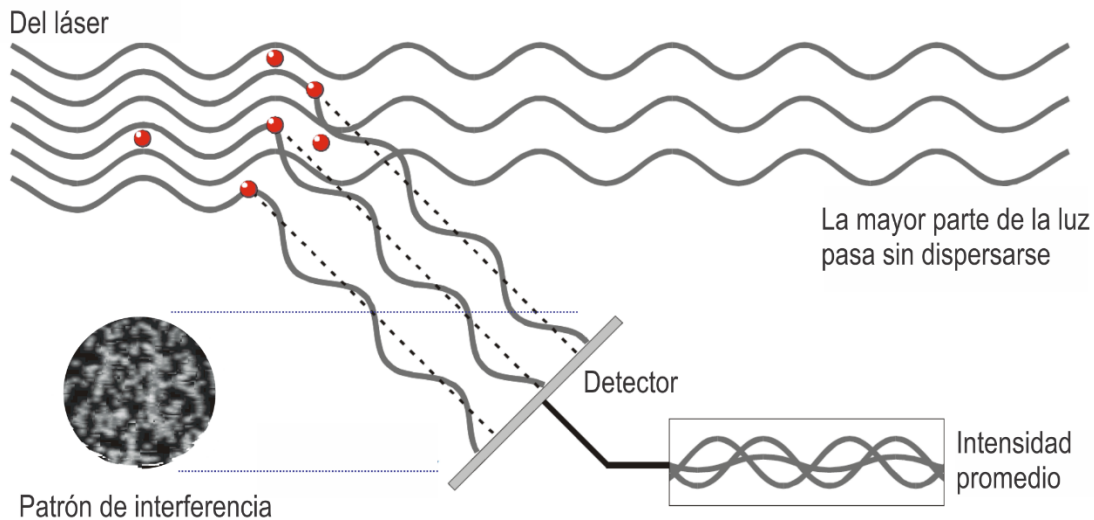


Figura 4. Luz proveniente de un láser es dispersada por partículas y detectada en forma de un patrón de interferencia de moteado. Esquema modificado del manual del usuario del Zetasizer nano (MAN0485, 2013).

Las partículas suspendidas en un líquido se encuentran en constante movimiento debido a colisiones aleatorias con las moléculas del líquido, esta clase de movimiento se conoce como movimiento browniano. Las partículas más pequeñas se ven más afectadas por las colisiones aleatorias y eso se refleja en una mayor rapidez con respecto a partículas grandes. Por lo tanto, el patrón de interferencia de moteado cambia con el tiempo ya que refleja el movimiento de las partículas en solución y consecuentemente la intensidad de la luz dispersada, las áreas brillantes y oscuras, fluctuará en cada punto del detector. La tasa de fluctuación es utilizada para calcular el tamaño de partícula, una tasa de fluctuación elevada es interpretada como un tamaño pequeño de partícula.

Para calcular la distribución de tamaños de partículas la señal del detector es enviada a un correlacionador digital que mide el grado de similitud entre dos señales durante un periodo de tiempo (típicamente 1-10 milisegundos), una típica función de correlación se muestra en la Figura 5. La dispersión dinámica de luz mide el movimiento browniano utilizando las fluctuaciones de los patrones de interferencia moteados.

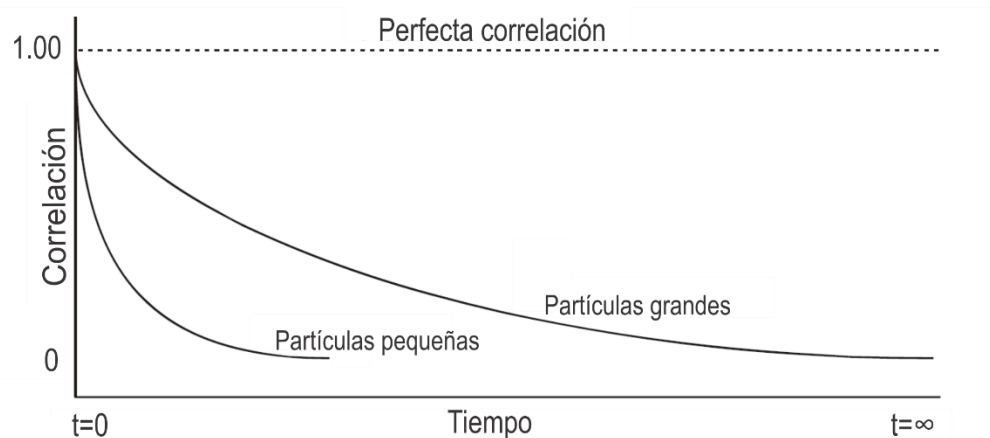


Figura 5. Gráfica que muestra la función de correlación para partículas largas y partículas pequeñas. La tasa de decaimiento de la función de correlación está relacionada al tamaño de partícula, esto es, la tasa de decaimiento es más rápida para partículas pequeñas. Esquema modificado del manual del usuario del Zetasizer nano (MAN0485, 2013).

Para convertir la medición de movimiento browniano a tamaño de partícula se utiliza la ecuación de Stokes-Einstein, ecuación 7, que establece la relación entre el tamaño de una partícula (radio hidrodinámico r_H) y la velocidad debido al movimiento browniano:

$$7) r_H = \frac{kT}{6\pi D\eta}$$

donde k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta, D es un coeficiente de difusión calculado y η es la viscosidad de la solución en donde se encuentra la partícula.

El diámetro hidrodinámico de una molécula está definido por una esfera con diámetro igual a la longitud de la molécula, y no debe de confundirse con peso molecular (Snyder, Kirkland, & Dolan, 2010), ver Figura 6.

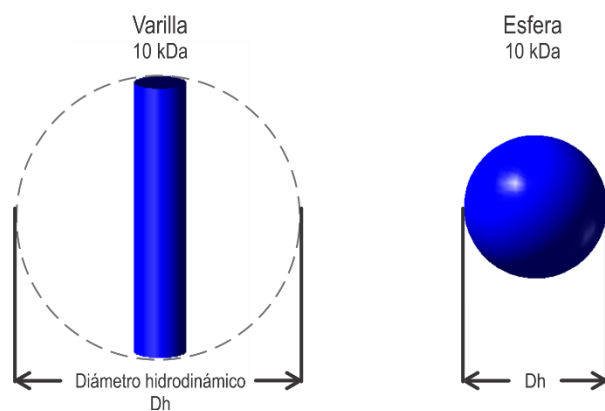


Figura 6. Esquema que ilustra la diferencia entre peso molecular y diámetro hidrodinámico. Modificado de Snyder (2010).

4.1. Caracterización por dispersión dinámica de luz

Para evaluar si existe un cambio conformacional de las partículas pseudovirales de P22 ante diferentes condiciones de pH y fuerza iónica, se diseñó un experimento mediante el cual se monitoreó el diámetro hidrodinámico de las partículas por dispersión dinámica de luz en un equipo Zetasizer Nano ZS (He-Ne 633 nm, Malvern Instruments Ltd.). Dado que la medición es una aproximación que depende en cierto grado de la viscosidad del medio se prepararon 42 soluciones amortiguadoras de acuerdo con lo especificado en la Tabla II, durante la preparación se procuró que la incertidumbre fuera siempre menor al 7% en masa del reactivo. Los valores de las concentraciones de las especies químicas presentes en las soluciones amortiguadoras se introdujeron al software Zetasizer 7.12 (Malvern Instruments Ltd.) para calcular un valor estimado de la viscosidad y el índice de refracción de las soluciones.

Se preparó cada solución amortiguadora en un matraz bola de fondo plano aforado de 50 ml. Se reunieron todas las soluciones con el mismo pH en orden creciente de fuerza iónica, después se procedió a realizar de manera secuencial el siguiente procedimiento:

- Se tomaron cinco mililitros de solución amortiguadora y se hicieron pasar por un filtro de 0.22 μm , los primeros tres mililitros se descartaron y se depositó 1 ml en un tubo limpio y estéril de microcentrífuga, este se tapó y se almacenó a 25 °C. Antes de reutilizar el filtro se hacían pasar 15 ml de H_2O d, después se hacía pasar aire para eliminar los restos de H_2O d y posteriormente se filtraba otra solución amortiguadora de mismo pH y mayor fuerza iónica. Al terminar de filtrar las soluciones de un pH dado se enjuagó el filtro con un volumen de 25 ml de H_2O d.

A tres de los tubos de microcentrífuga con soluciones amortiguadoras de mismo pH y diferente fuerza iónica se les adicionaron 16 μl del concentrado del lote I (145 μg de proteína en 100 mM de Tris-HCl pH 8.0). Antes de iniciar las mediciones se dejaron incubar a 25 °C durante una hora. Este proceso se repitió hasta completar el análisis de las 42 condiciones. Se utilizó la celda capilar plegada DTS1070 (Malvern Instruments Ltd.) para todas las mediciones, cada medición reportada es el promedio de 5 mediciones realizadas.

Tabla II. Composición de las soluciones amortiguadoras usadas para DLS

pH (I=0.90)	HA	A	NaCl
3.0	98.4 mM ácido acético	1.6 mM acetato de sodio	898.4 mM
4.0	78.9 mM ácido acético	21.1 mM acetato de sodio	878.9 mM
5.0	27.1 mM ácido acético	72.9 mM acetato de sodio	827.1 mM
6.0	80.7 mM NaH_2PO_4	19.3 mM Na_2HPO_4	761.4 mM
7.0	29.4 mM NaH_2PO_4	70.6 mM Na_2HPO_4	658.8 mM
8.0	64.0 mM Tris-HCl	36.0 mM Tris base	836.0 mM
9.0	15.1 mM Tris-HCl	84.9 mM Tris base	884.9 mM
pH (I=0.75)	HA	A	NaCl
3.0	98.4 mM ácido acético	1.6 mM acetato de sodio	748.4 mM
4.0	78.9 mM ácido acético	21.1 mM acetato de sodio	728.9 mM
5.0	27.1 mM ácido acético	72.9 mM acetato de sodio	677.1 mM
6.0	81.4 mM NaH_2PO_4	18.6 mM Na_2HPO_4	612.8 mM
7.0	30.4 mM NaH_2PO_4	69.6 mM Na_2HPO_4	510.8 mM
8.0	64.0 mM Tris-HCl	36.0 mM Tris base	686.0 mM
9.0	15.1 mM Tris-HCl	84.9 mM Tris base	734.9 mM

Tabla II (continuación). Composición de las soluciones amortiguadoras usadas para DLS

pH (I=0.60)	HA	A	NaCl
3.0	98.4 mM ácido acético	1.6 mM acetato de sodio	598.4 mM
4.0	79.3 mM ácido acético	20.7 mM acetato de sodio	579.3 mM
5.0	27.6 mM ácido acético	72.4 mM acetato de sodio	527.6 mM
6.0	82.4 mM NaH ₂ PO ₄	17.6 mM Na ₂ HPO ₄	464.8 mM
7.0	31.9 mM NaH ₂ PO ₄	68.1 mM Na ₂ HPO ₄	363.8 mM
8.0	63.5 mM Tris-HCl	36.5 mM Tris base	536.5 mM
9.0	14.8 mM Tris-HCl	85.2 mM Tris base	585.2 mM
9.0	14.5 mM Tris-HCl	85.5 mM Tris base	435.5 mM
pH (I=0.30)	HA	A	NaCl
3.0	98.6 mM ácido acético	1.4 mM acetato de sodio	298.6 mM
4.0	80.3 mM ácido acético	19.7 mM acetato de sodio	280.0 mM
5.0	29.0 mM ácido acético	71.0 mM acetato de sodio	229.0 mM
6.0	84.9 mM NaH ₂ PO ₄	15.1 mM Na ₂ HPO ₄	169.8 mM
7.0	36.0 mM NaH ₂ PO ₄	64.0 mM Na ₂ HPO ₄	72.0 mM
8.0	61.9 mM Tris-HCl	38.1 mM Tris base	238.1 mM
9.0	14.0 mM Tris-HCl	86.0 mM Tris base	286.0 mM
pH (I=0.15)	HA	A	NaCl
3.0	98.8 mM ácido acético	1.2 mM acetato de sodio	148.8 mM
4.0	81.5 mM ácido acético	18.5 mM acetato de sodio	131.5 mM
5.0	30.4 mM ácido acético	69.6 mM acetato de sodio	80.4 mM
6.0	87.1 mM NaH ₂ PO ₄	12.9 mM Na ₂ HPO ₄	24.2 mM
7.0	93.8 mM Tris-HCl	6.2 mM Tris base	56.2 mM
8.0	60.2 mM Tris-HCl	39.8 mM Tris base	89.8 mM
9.0	13.1 mM Tris-HCl	86.9 mM Tris base	136.9 mM

Resultados

1. Niveles de expresión del esquema de inducción

La estrategia para la expresión de las VLPs consistió en hacer uso del plásmido pLysS para controlar la expresión basal de la proteína de capa, aumentar el nivel de aireación manteniendo una proporción al utilizar solo una quinta parte del volumen del matraz Erlenmeyer, además de realizar la inducción a altas densidades ópticas para homogenizar la exposición al inductor L-arabinosa y por consiguiente la concentración de proteína de andamiaje por célula. Para obtener información acerca de la expresión heteróloga se realizó un gel de electroforesis de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 12% con alícuotas del medio de cultivo (del lote II) en diferentes intervalos del esquema de inducción, ver Figura 7.

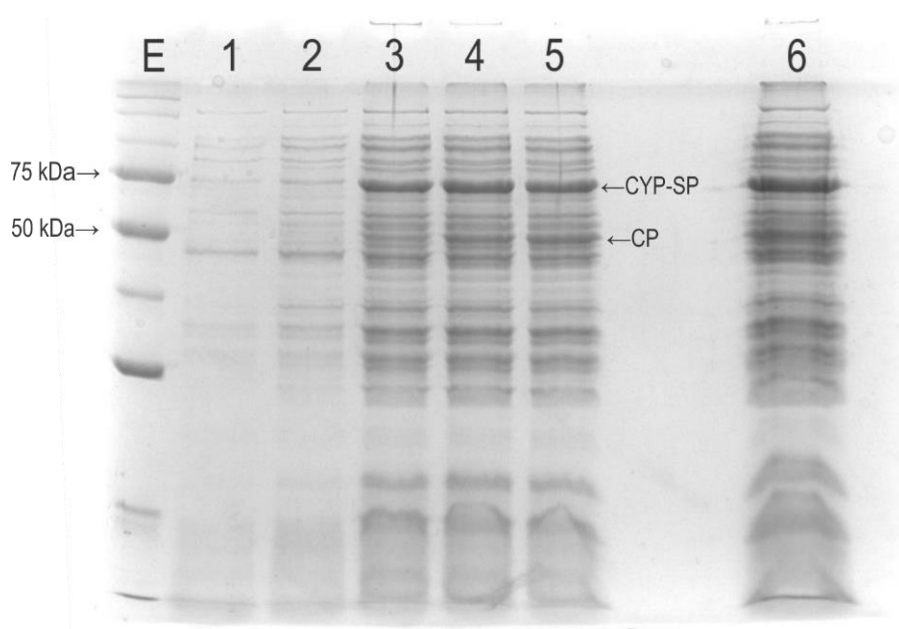


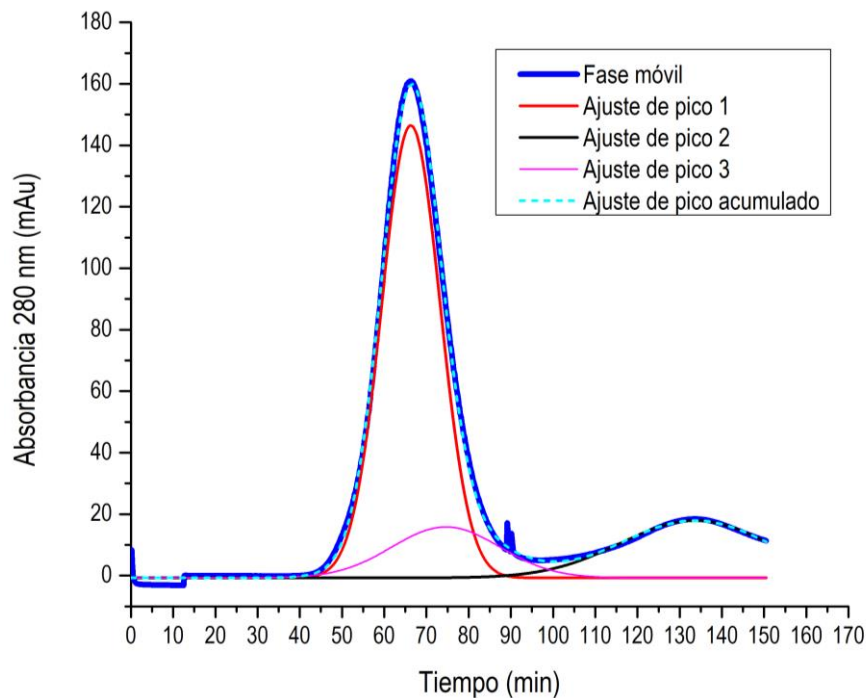
Figura 7. SDS-PAGE de diferentes etapas del esquema de inducción del lote II. E) escalera 10-250 kDa Precision Plus Protein™ (Bio-Rad), 1) Alícuota del cultivo después de 5.5 h, 2) alícuota antes de inducción con arabinosa (7 h), 3) alícuota del cultivo antes de inducción con IPTG (23 h), 4) alícuota del cultivo (26 h), 5) alícuota final de un cultivo con 0.5 más arabinosa, 6) alícuota del cultivo (26h) se cargó el doble de muestra (15 µl). Tinción con Coomassie.

De la Figura 7, al observar las líneas de los pozos 5 y 6 se puede concluir que el incremento de la concentración de arabinosa no influye significativamente en la producción de CYP-SP por cultivo. Además, no parece haber una expresión basal de CP mayor a la expresión basal de CYP-SP como se puede observar en la muestra cargada en los pozos 1 y 2, lo que descarta la expresión basal de

CP como factor causante de la presencia de cápsidas aberrantes. Los niveles de expresión de la CYP-SP son aparentemente superiores a los de la CP al final del tiempo de inducción, pozos 4-6.

2. Purificación de VLPs

Todos las curvas de absorbancia de los cromatogramas se analizaron en el software OriginPro 9.0, se propuso un modelo de ajuste gaussiano para separar las curvas en picos individuales (que representan poblaciones de partículas con absorción a 280 nm) y se calculó el área bajo la curva de los picos propuestos. Se utilizó un código de color para distinguir las distintas poblaciones en la fase móvil. El color verde corresponde a la población de partículas aberrantes con diámetro hidrodinámico de ~70 nm, el color rojo representa la población de partículas tipo virus con diámetro de 58 nm, el color magenta se utiliza para representar una población hipotética responsable del cambio en la absorbancia de fondo, finalmente el color negro se utiliza para representar una población mixta de proteínas de menor diámetro hidrodinámico presentes en la muestra.



El cromatograma del lote I (Figura 8) muestra que las condiciones a las cuales se llevaron a cabo los cultivos resultaron en una baja producción de partículas aberrantes (no detectables). Sin embargo, el ajuste gaussiano sugirió la presencia de una población con un tiempo de retención de 74.6 min y con un ancho de pico al nivel de la línea de referencia (W) que se conjunta con el de las partículas pseudovirales que tienen un tiempo de retención de 66.5 min. Se recolectaron las fracciones eluidas del minuto 62.1 al minuto 86.1 y se analizó el concentrado por electroforesis de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), el gel se muestra en la Figura 14.

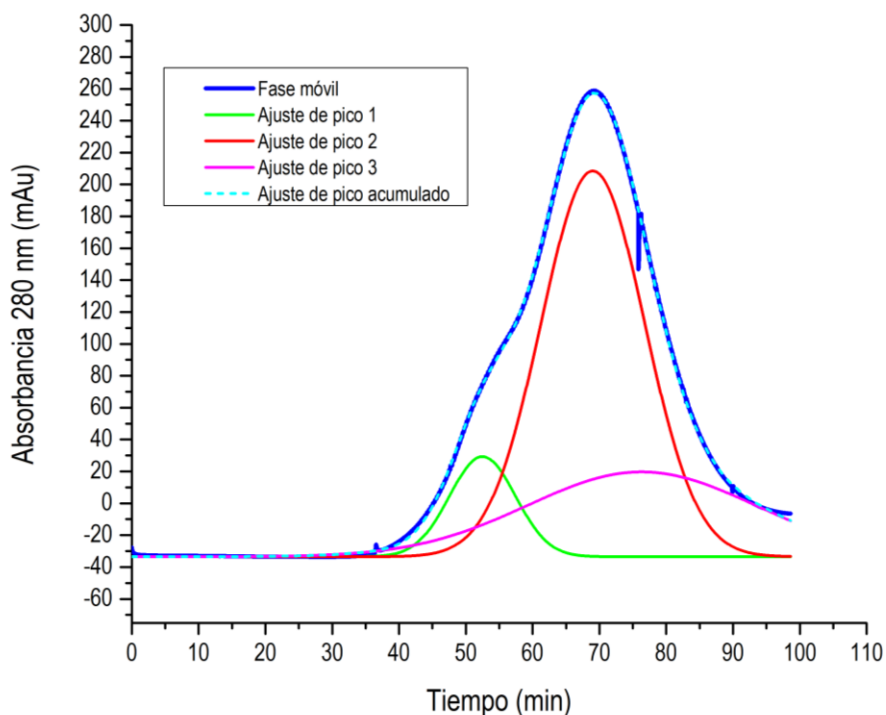


Figura 9. Cromatograma del lote II (flujo 1.0 ml/min). Se ha propuesto un modelo de ajuste gaussiano (color cian) con R^2 ajustada de 0.99965. Con respecto al área absoluta del ajuste (cian) las áreas bajo la curva de los picos propuestos son: 10 % verde, 62 % rojo, 27 % magenta. Los tiempos de retención (máximos) se identificaron en los minutos 52.5, 69.0, y 76.3 respectivamente.

Por otra parte en el cromatograma correspondiente al lote II (Figura 9) se pueden observar tres picos correspondientes a las poblaciones de: partículas aberrantes, partículas pseudovirales bien ensambladas y la población desconocida. Las partículas aberrantes representaron el 10% de la absorbancia de la muestra, mientras que las partículas pseudovirales y la población desconocida el 62% y el 27% respectivamente. Se recolectaron 6 fracciones correspondientes al intervalo que va del minuto 49.1 al minuto 88.1. Se analizó el contenido proteico de la muestra antes de la cromatografía, las fracciones colectadas y el concentrado de las fracciones mediante SDS-PAGE al 12% a 137 V, ver

Figura 10. Asumiendo que se recolecta exactamente toda la población de partículas pseudovirales y de la población mixta se tendría que la población desconocida representa aproximadamente el 30% de la composición proteica, por lo cual la población desconocida debe tener una banda de tamaño significativo en el gel.

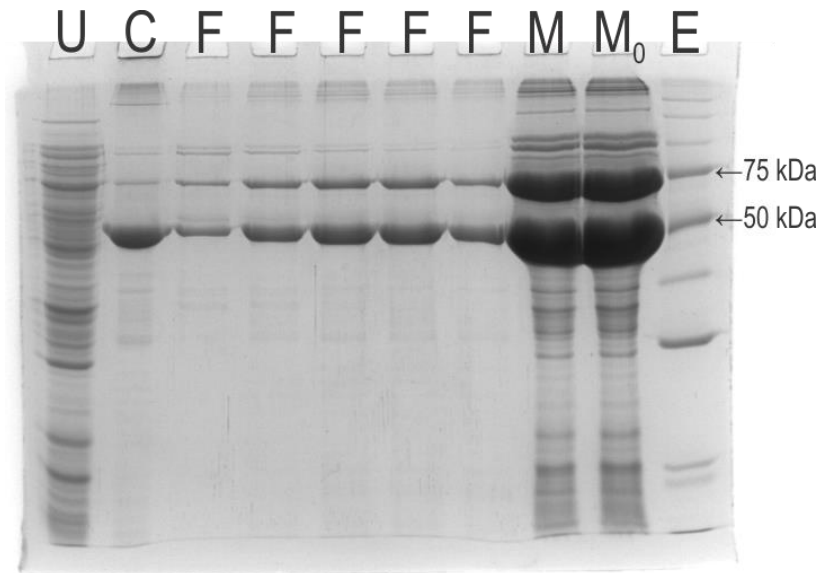


Figura 10. Gel de electroforesis de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio para análisis de lote II. U) sobrenadante de la ultracentrifugación con colchón de sacarosa, C) concentrado de las fracciones de la cromatografía, F) fracciones de cromatografía, M) muestra antes de cromatografía sin filtrar, M₀) muestra antes de la cromatografía filtrada (0.22 μm) y E) escalera 10-250 kDa Precision Plus Protein™ (Bio-Rad). Tinción con Coomassie.

Del gel de electroforesis de la Figura 10 es posible notar que al descartar el sobrenadante en la ultracentrifugación con colchón de sacarosa se reduce la concentración de un gran número de proteínas (carril U) entre las cuales destaca la proteína CYP-SP (71.5 kDa). También se puede concluir que el proceso de filtrado con nitrocelulosa de un tamaño de poro de 0.22 μm no disminuye la concentración de ninguna proteína, por lo que se descarta la presencia de agregados proteicos de diámetro superior a 0.22 μm después de la centrifugación a 12,000 × g, el rendimiento de proteína por litro de cultivo hasta la muestra M₀ es 150 mg/litro de cultivo. Además de la observación de las fracciones purificadas del gel no es posible discernir una banda proteica de tamaño significativo, únicamente se muestran las bandas correspondientes al peso molecular de la CYP-SP y CP. Al comparar el concentrado de las fracciones con respecto a las fracciones, en el gel, se observó un cambio en la proporción de proteínas de la VLP así que se analizó el gel por densitometría con el software ImageJ, ver Figura 11.

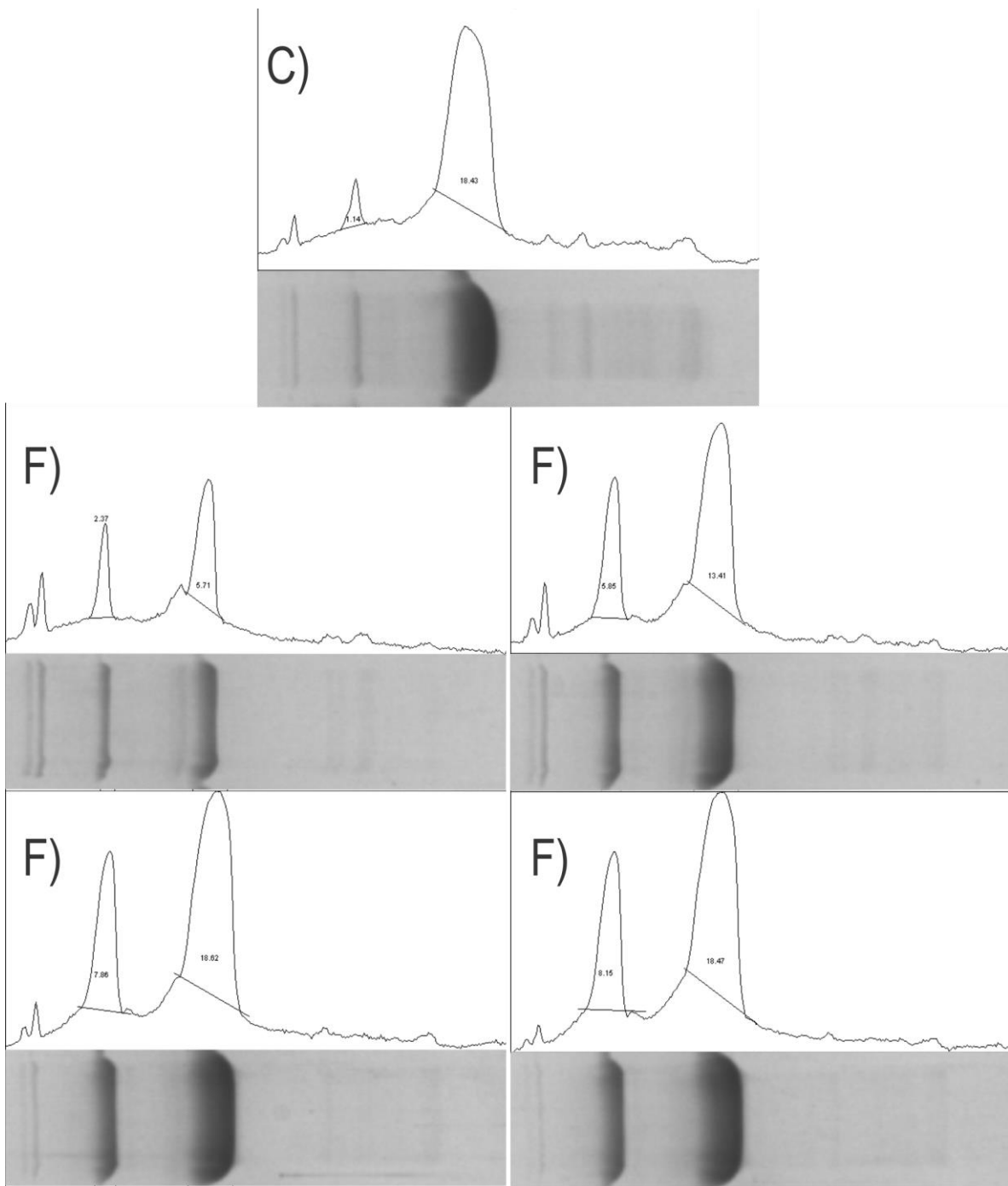


Figura 11. Densitometría del gel SDS-PAGE de las fracciones y del concentrado del lote II. La tasa $\frac{CP}{CYP-SP}$ de intensidad promedio fue para F) 2.34 ± 0.07 y para C) 16.17.

Para el análisis de densitometría se descartó una de las fracciones de la cromatografía ya que el área de análisis se encontraba distorsionada. La tasa de intensidad $\frac{CP}{CYP-SP}$ fue de $2.34 \pm .07$ para las fracciones y 16.17 para el concentrado de las fracciones. La proteína CYP-SP representó en todas las fracciones el $30 \pm .6\%$ de la intensidad, mientras que en el concentrado de las fracciones la CYP-SP tuvo una intensidad del 0.06%, lo que significa que durante la ultracentrifugación sin colchón de sacarosa hubo aproximadamente una pérdida del 30% de la proteína total recolectada (CP + CYP-SP). Esto sugiere que la población desconocida es al menos en su mayoría resultado de interacciones de CYP-SP libre (no encapsulado), estas proteínas formarían cuerpos de diámetro hidrodinámico suficiente para tener un tiempo de retención mayor que las proteínas basales de la cepa. Si se desea la optimización de las condiciones de cultivo para el proceso de ensamblaje *in vivo*, la población del pico magenta debe ser monitoreada puesto que podría ser un indicador indirecto de la eficiencia en la encapsulación de proteína de andamiaje y enzima.

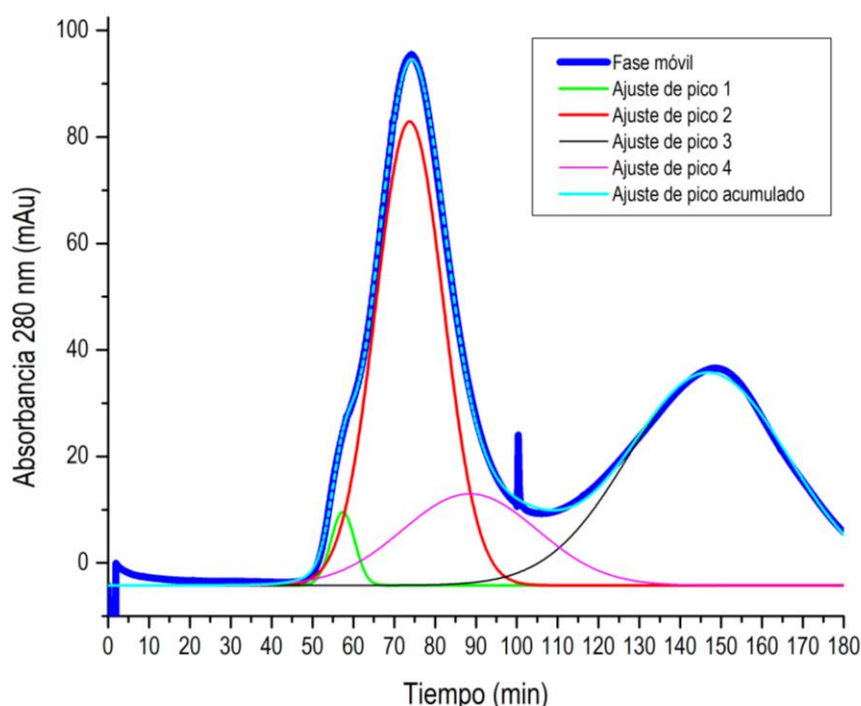


Figura 12. Cromatograma del lote III (flujo 0.9 ml/min). Se ha propuesto un modelo de ajuste gaussiano (color cian) con R^2 ajustada de 0.99026. Con respecto al área absoluta del ajuste (cian) las áreas bajo la curva de los picos propuestos son: 2 % verde, 40 % rojo, 42 % negro y 16 % magenta. Los tiempos de retención (máximos) se identificaron en los minutos 57.5, 73.8, 147.0 y 88.5 respectivamente.

El cromatograma del lote III (Figura 12) muestra nuevamente las poblaciones de partículas aberrantes, pseudovirales, así como la población desconocida y la de proteínas de diámetro hidrodinámico pequeño. Dado que el lote III es resultado de variaciones en la temperatura con respecto al lote I se puede concluir que el proceso de ensamblaje *in vivo* es sensible a la temperatura. Esto

concuerta con lo reportado por Miguel-Alejandro (2015) que reportó una mayor proporción de estructuras aberrantes cuando incrementó la temperatura a 36 °C. Lo que indica que la fidelidad del ensamble *in vivo* es sensible a la temperatura con o sin el uso del plásmido pLysS.

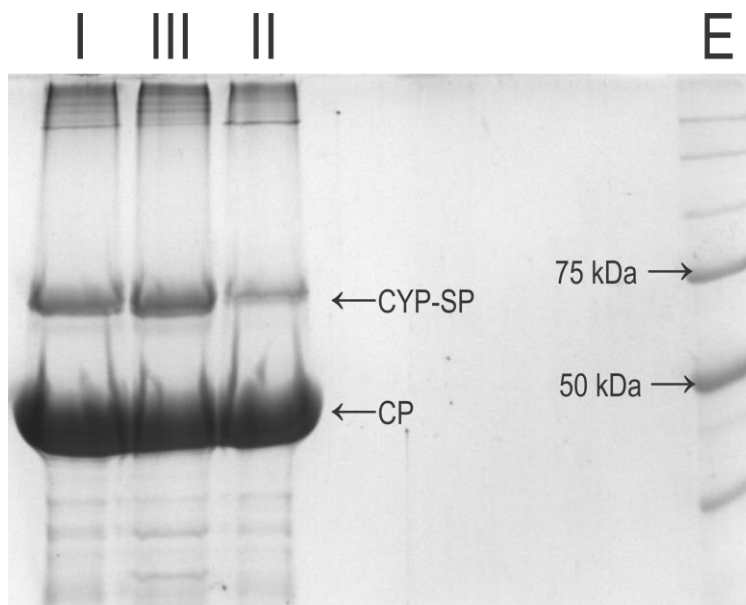


Figura 13. Gel SDS-PAGE al 12%, se muestran los concentrados del lote I, lote III, lote II, y la escala 10-250 kDa Precision Plus Protein™ (Bio-Rad). Tinción con Coomassie.

De la Figura 13 se puede observar que el nivel de CYP-SP encapsulado por VLP puede variar dependiendo de las condiciones de inducción, aunque se desconoce el mecanismo exacto probablemente está relacionado a la densidad óptica en el tiempo de inducción, así como la presencia de cuerpos de inclusión que disminuyen el número de interacciones de la CYP-SP durante el proceso de ensamble. Si bien, los cromatogramas respectivos de los lotes garantizan una similitud en el diámetro hidrodinámico de las VLPs, el peso molecular debe ser distinto de acuerdo a la proporción mostrada en la Figura 13. Lo que implica que el volumen interno de las VLPs del lote II no está saturado, condición que podría ser deseable para futuros bionanorreactores en donde una alta ocupación del volumen interno con un alto confinamiento de la enzima induzca cambios conformacionales de la enzima y en consecuencia disminuya la eficiencia del bionanorreactor.

Finalmente para confirmar el estado de los concentrados de VLPs se realizó un gel de electroforesis nativa en agarosa al 0.8% en solución amortiguadora 40 mM Tris-base, 5 mM acetato de sodio, 1 mM EDTA y ajustada a pH 8.2 con HCl, la misma solución amortiguadora se utilizó para sumergir el gel durante una hora a 65 V, protocolo basado en el de Lucon et al. (2012). En el gel, mostrado en la Figura 14, se distingue que en todos los concentrados las VLPs forman una sola población (una sola banda) y no hay un halo que indique una degradación considerable. El tiempo de

corrida de una hora no mostró diferencias significativas en el movimiento electroforético entre los tres lotes de VLPs.

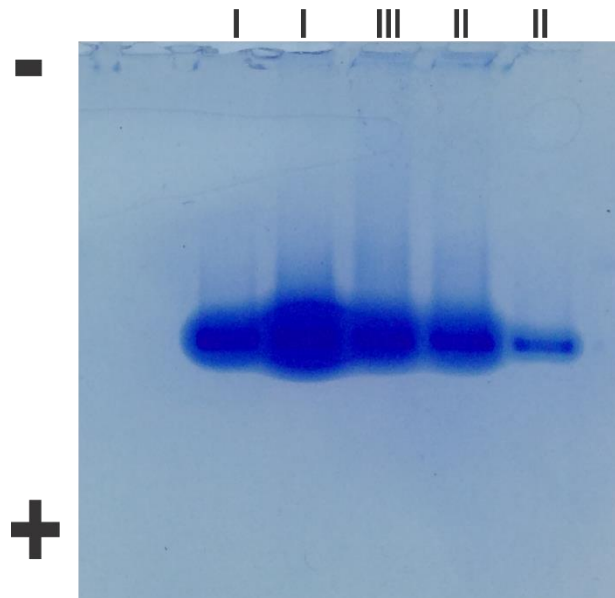


Figura 14. Gel de proteína nativa en 0.8% de agarosa (46 ml). Se cargaron las VLPs de los concentrados de los lotes I, III y II. La tinción se realizó con InstantBlue.

3. Determinación de la estabilidad estructural de los bionanorreactores por dispersión dinámica de luz

Los resultados de la dispersión dinámica de luz de los bionanorreactores se muestran en la Tabla III, además en el apéndice se incluyen las gráficas de las intensidades correspondientes a cada población de tamaño. El diámetro hidrodinámico de la mayoría de las mediciones (promedio Z) coincide con el diámetro reportado de las estructuras procápside (~58 nm), con excepción de las soluciones con pH menor a cuatro. El promedio Z es la medida más significativa de la técnica siempre que se tenga un índice de polidispersión bajo, por lo que para representar las medidas realizadas a pH 3.0 se incluyó una gráfica que ilustra el número de partículas de cada tamaño, si bien es solo una aproximación que depende de la viscosidad y del índice de refracción del dispersante se consideró importante para determinar el estado de las VLPs, ver Figura 18.

No se encontró un cambio de diámetro significativo en las mediciones de pH 4-9 de acuerdo a lo mostrado por la Figura 16, que presenta un esquema de los diámetros hidrodinámicos (promedio Z) de todas las muestras. Para complementar se realizó un análisis de varianza de un sentido (ANOVA) del promedio Z y la desviación estándar de las 36 muestras con tratamientos de pH ≥ 4 que representan cinco observaciones cada una ($J_i = 5$), se obtuvo un P-valor de 1.0. Por lo cual se puede aceptar la hipótesis nula (H_0) y dentro de las 36 muestras no hay dos o más promedios distintos. De haberse encontrado un promedio distinto eso indicaría que alguna de las condiciones de incubación favoreció alguna de las distintas estructuras que se han reportado para las VLPs del P22. En la Figura 17 se presentan los promedios Z de pH ≥ 4 con sus desviaciones estándar.

Tabla III. Resultados del análisis por dispersión dinámica de luz de las VLPs

pH (I=0.90)	Promedio Z (nm)	Desviación estándar muestral (nm)	Índice de polidispersión	Potencial Z* (mV)	Desviación estándar (mV)
3.0	3004*	$\pm 2170^*$	0.522	5.59	± 1.81
4.0	59.01	± 7.582	0.017	-6.58	± 2.45
5.0	64.39	± 25.78	0.160	-8.36	± 1.42
6.0	58.27	± 13.61	0.055	-10.2	± 3.67
7.0	58.43	± 8.671	0.022	-11.1	± 2.33
8.0	58.12	± 8.013	0.019	-8.22	± 2.05
9.0	57.63	± 9.330	0.026	-8.12	± 2.51
(I=0.75)					
3.0	3138	± 1949	0.386	6.44	± 1.06
4.0	59.43	± 7.510	0.016	-7.2	± 0.922
5.0	59.46	± 8.002	0.018	-6.22	± 2.08
6.0	56.82	± 11.22	0.039	-7.51	± 2.18
7.0	58.55	± 7.352	0.015	-7.42	± 2.78
8.0	59.41	± 12.04	0.037	-7.9	± 2.28
9.0	58.33	± 6.743	0.013	-11.5	± 2.79
(I=0.60)					
3.0	3123*	$\pm 2182^*$	0.488	4.12	± 1.02
4.0	59.06	± 7.338	0.015	-6.22	± 2.85
5.0	59.05	± 6.381	0.012	-5.56	± 5.14
6.0	57.38	± 12.86	0.050	-7.94	± 1.49
7.0	56.57	± 7.498	0.018	-12.3	± 1.8
8.0	58.39	± 8.386	0.021	-11.3	± 2.4
9.0	58.41	± 9.501	0.026	-9.67	± 1.56

Tabla III (continuación). Resultados del análisis por dispersión dinámica de luz de las VLPs

(I=0.45)					
3.0	-	-	>0.7	--	--
4.0	59.12	±9.461	0.026	-5.33	±1.42
5.0	59.57	±8.097	0.018	-8.73	±1.32
6.0	56.72	±6.109	0.012	-11.7	±2.04
7.0	58.19	±7.042	0.015	-14.6	±2.81
8.0	59.41	±11.49	0.037	-11	±2.51
9.0	58.31	±7.849	0.018	-10	±1.87
(I=0.30)					
3.0	237.4	±162.3	0.467	11	±0.806
4.0	59.77	±9.628	0.026	-4.62	±2.21
5.0	59.90	±12.22	0.042	-11.2	±1.35
6.0	56.39	±4.453	0.006	-11.6	±1.73
7.0	58.53	±13.78	0.055	-12.5	±0.898
8.0	58.74	±6.658	0.013	-11.2	±1.43
9.0	59.69	±7.357	0.015	-12.8	±1.61
(I=0.15)					
3.0	89.01	±42.14	0.224	8.75	±2.5
4.0	63.46	±21.80	0.118	-3.72	±0.162
5.0	63.24	±14.53	0.053	-10.6	±0.936
6.0	57.41	±16.15	0.079	-20	±0.65
7.0	58.44	±7.626	0.017	-12.5	±1.41
8.0	58.33	±9.088	0.024	-16.4	±0.653
9.0	59.21	±8.850	0.022	-13.8	±1.52

(*) Los potenciales Z y sus desviaciones estándar realizados por análisis monomodal también se incluyeron.

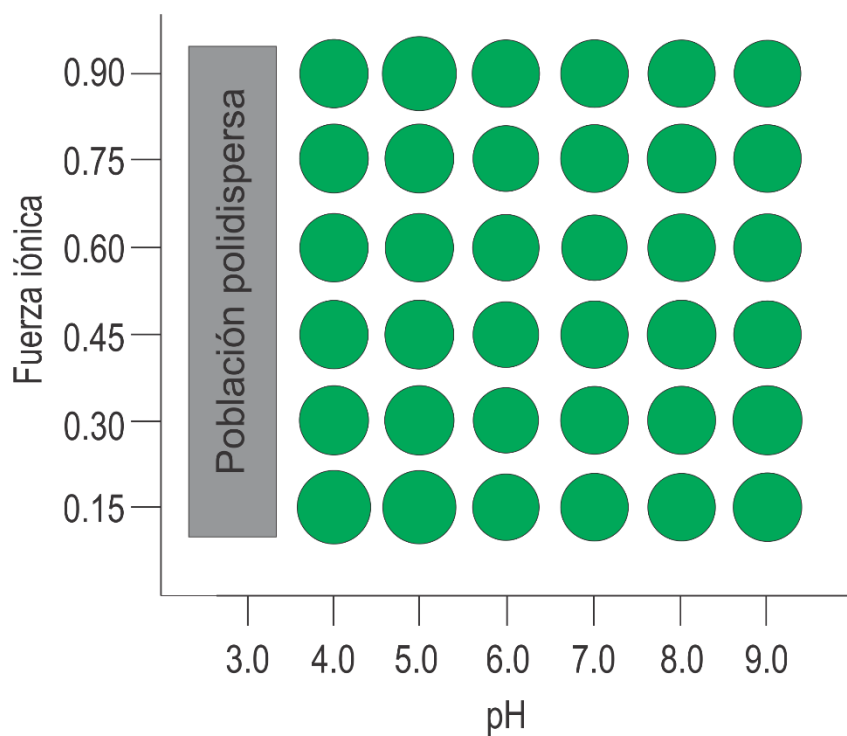


Figura 16. Esquema de resultados del diámetro hidrodinámico de las VLPs a diferentes concentraciones de fuerza iónica y pH. El diámetro de los círculos es proporcional al promedio Z de la Tabla III.

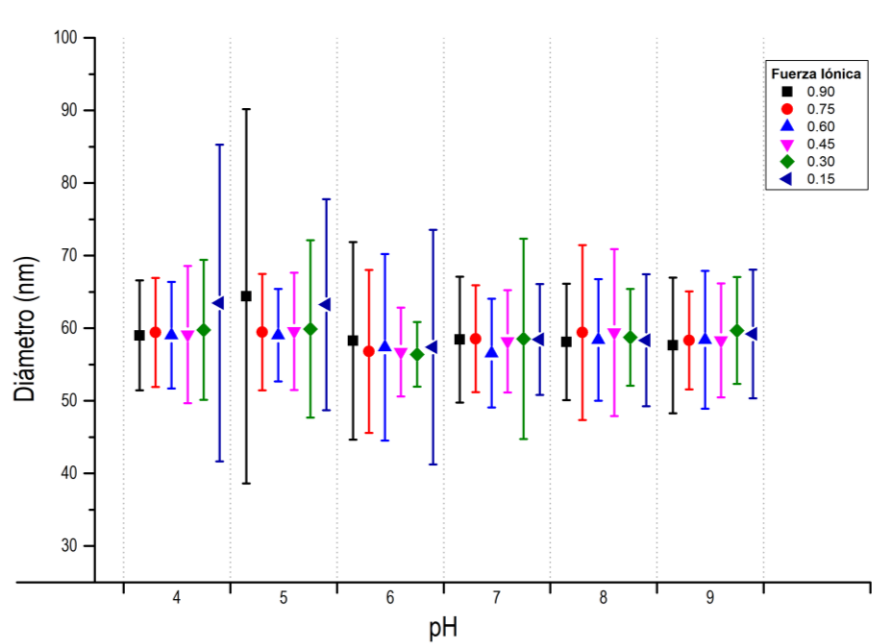


Figura 17. Gráfica de dispersión de los promedios Z para $\text{pH} \geq 4$ obtenidos en la Tabla III. Las barras de error representan la desviación estándar muestral.

La medida correspondiente a la solución con pH 3.0 e I=0.45 resultó con índice de polidispersión mayor a 0.7 por lo que no fue posible obtener su medición y se asume un comportamiento similar a las demás soluciones a pH 3. Como se observa en el esquema de la Figura 16 las VLPs son inestables a pH 3 y algunos elementos que las conforman tienden a agregarse, y por tanto el número de partículas que dispersan la luz aumenta para diámetros >58 nm. Sin embargo, la presencia de partículas con diámetros <58 nm sugiere que las VLPs no se agregan completas, en su lugar parece haber un desensamble de la estructura ya sea en capsómeros, liberación de CYP-SP o formación de otros agregados de menor tamaño, ver Figura 18. Además, parece haber un comportamiento con respecto a la fuerza iónica en el cual una mayor fuerza iónica estaría asociado a procesos de agregación, mientras que una menor fuerza iónica a procesos de desensamble de la estructura.

Aunque, de manera concluyente la estabilidad estructural del bionanorreactor se conserva a pH 5, Sánchez-Sánchez (2014) describió una pérdida en la actividad peroxigenasa del 65% después de una hora de incubación a pH 5 mientras bajo el mismo tratamiento la variante del CYP-P450_{BM-3} 21B3 libre se precipitó y perdió 97.1% de la actividad catalítica. Los dos resultados, la conservación de la actividad catalítica del bionanorreactor con respecto a la enzima libre a pH 5 y desensamble del bionanorreactor a pH < 4, parecen descriptibles por el punto isoeléctrico (pI) de las proteínas. La cercanía al punto isoeléctrico de una proteína significa que se alcanza una carga eléctrica neta de cero y tiende a precipitarse. La enzima libre tiene un pI de ~5.3 de acuerdo con resultados experimentales (Sánchez-Sánchez, 2014), teóricamente la variante de CYP unida a la SP tiene un punto isoeléctrico de 6.12 (calculado con ProtParam) y la CP un pI= 4.97 (Parent, Gilcrease, Casjens, & Baker, 2012). Al someter las proteínas del bionanorreactor a valores de pH mucho menores al punto isoeléctrico hay un cambio (con respecto a las condiciones nativas) en la polaridad y magnitud de la carga eléctrica neta que posiblemente desestabiliza las interacciones electrostáticas propias de la cápside, lo que causa el desensamble, pérdida de la actividad enzimática y propicia fenómenos de agregación si las cargas de los monómeros son de baja magnitud o si existe un apantallamiento de las cargas de las proteínas desensambladas (el fenómeno de apantallamiento de cargas crece con la magnitud de la fuerza iónica).

Las mediciones de potencial Z de los bionanorreactores a diferentes condiciones se representan gráficamente en la Figura 19. Interpolando los datos es posible sugerir que el punto isoeléctrico (pH en el cual el potencial Z es cero) de los bionanorreactores se encuentra entre los valores de pH: 3.4 y 3.6. Esta interpolación es válida solo si el punto isoeléctrico es mayor que el pH al cual se desensambla el bionanorreactor, en caso contrario esta construcción carecería de un punto isoeléctrico y no flocula mientras esté ensamblada. No es posible generalizar estos resultados a otras construcciones basadas en VLPs de P22 con diferentes cargos, ya que se desconoce la contribución de la carga eléctrica neta del cargo a la interacción entre proteínas de capa.

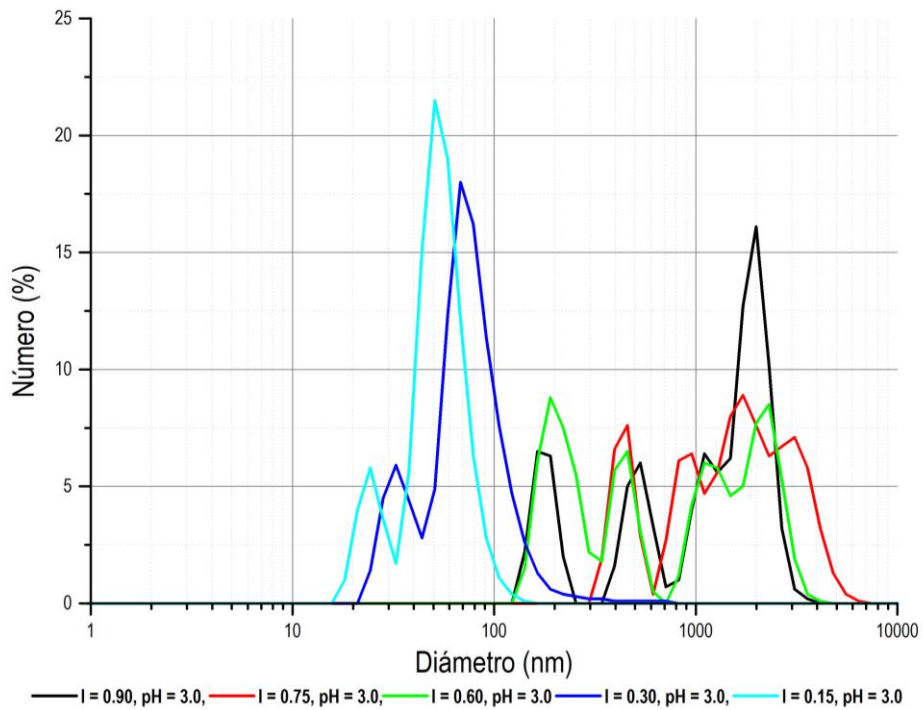


Figura 4. Gráfica que ilustra aproximadamente el número de partículas de cada tamaño (en porcentaje) que hay en las muestras colocadas a pH 3.0.

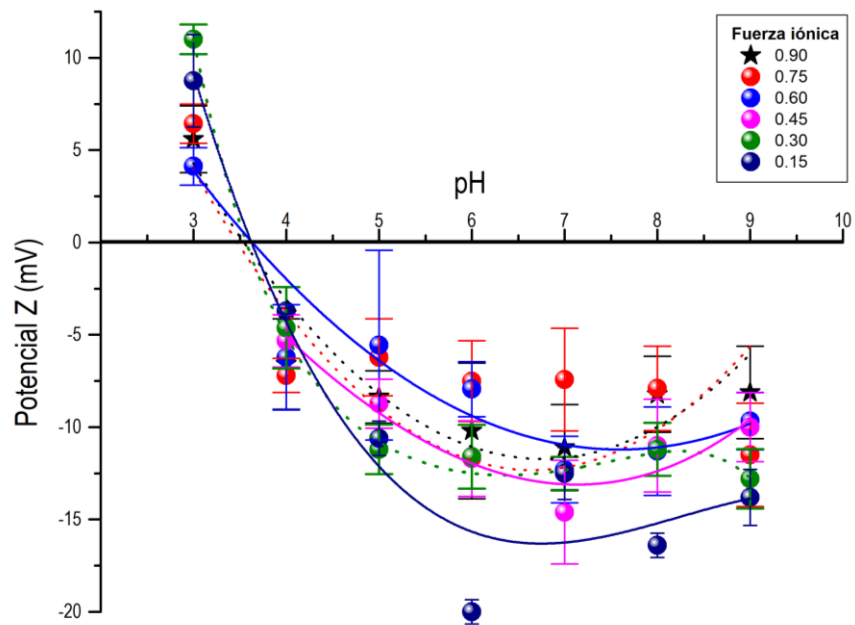


Figura 19. Gráfica que ilustra aproximadamente el potencial Z de la población de partículas sometida a diferentes condiciones de incubación. Las barras de error representan la desviación estándar. Las líneas sólidas y punteadas son guías visuales.

Conclusiones y perspectivas

Una de las mayores dificultades en la ingeniería que involucra nanoestructuras proteicas es la predicción de su estabilidad bajo diferentes condiciones. El conocimiento sobre los factores que definen la estabilidad de un sistema permite contemplarlo para futuras aplicaciones. Así, los resultados de este trabajo permiten considerar la estabilidad y el potencial uso de bionanorreactores derivados de la cápside del bacteriófago P22 en sistemas acuosos con $\text{pH} \geq 4$. Esto indica la posibilidad de disponer de una variedad de reacciones de funcionalización que requieren condiciones de reacción moderadamente agresivas.

El análisis de estabilidad, por potencial Z y dispersión dinámica de luz, remarcó la necesidad de estudiar otros sistemas basados en la VLP de P22. Particularmente la contribución que tienen los componentes del interior de la VLP para estabilizar o desestabilizar la unión de las proteínas de capa. Ya que se demostró una contribución significativa se podrían aprovechar las constantes de disociación ácida (o básica) de distintos péptidos fusionados a la proteína de andamiaje para diseñar VLPs de P22 como encapsulados inteligentes que se desensamblen (o no) a un valor de pH deseado. Los resultados de las mediciones de potencial Z sugieren que esta construcción derivada de la VLP de P22 tiene un punto isoeléctrico entre 3.4 y 3.6, aunque se desconoce si la VLP mantiene su conformación a estos valores de pH.

Adicionalmente se contribuyó a establecer nuevos detalles en el protocolo de purificación y expresión de las partículas pseudovirales que sin duda ayudarán a establecer mejores condiciones para maximizar el rendimiento en la producción de bionanorreactores correctamente ensamblados. Entre estos detalles se encuentra la cuantificación de la proporción entre bionanorreactores correctamente ensamblados y partículas aberrantes, se determinó que cambios en las condiciones de cultivo afectan la cantidad de enzima encapsulada por VLP, se midió con precisión los tiempos de retención, así como la densidad óptica a la cual se obtiene la mínima cantidad de partículas aberrantes. Finalmente, los resultados obtenidos, son los primeros que reflejan el uso del plásmido pLysS para controlar la expresión basal de la proteína de capa.

Los bionanorreactores/metabolones son estructuras de gran complejidad y por tanto es necesario resaltar que la gran flexibilidad de los sistemas demanda numerosos estudios antes de poder ser incorporados a aplicaciones altamente específicas.

Referencias

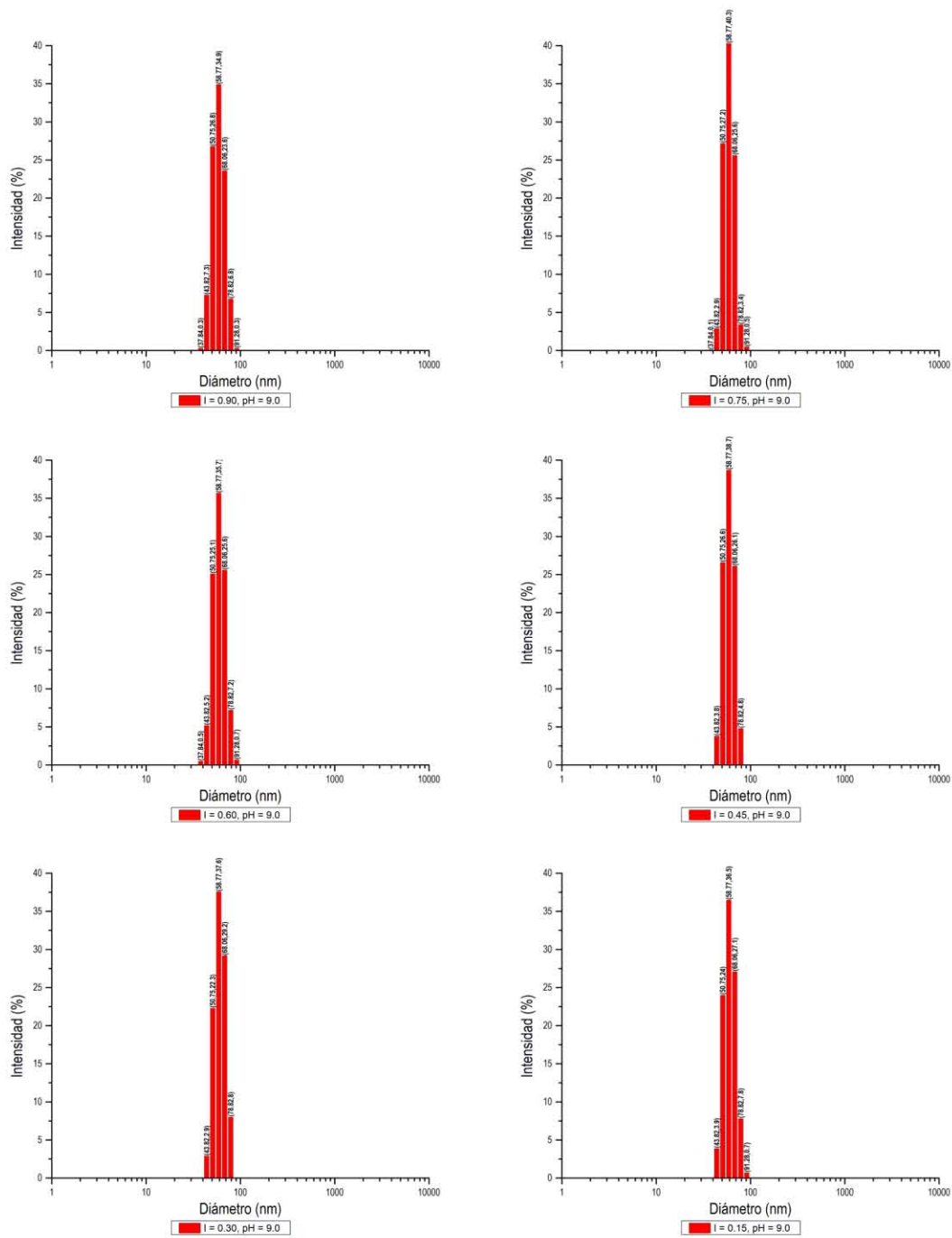
- Ahn, W. S., Park, S. J., & Lee, S. Y. (2000). Production of Poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution. *Appl Environ Microbiol*, 66(8), 3624-3627.
- Bancroft, J. B., Hills, G. J., & Markham, R. (1967). A study of the self-assembly process in a small spherical virus. Formation of organized structures from protein subunits in vitro. *Virology*, 31(2), 354-379. doi:[https://doi.org/10.1016/0042-6822\(67\)90180-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(67)90180-8)
- Banting, F. G., Best, C. H., Collip, J. B., Campbell, W. R., & Fletcher, A. A. (1922). Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Can Med Assoc J*, 12(3), 141-146.
- Bornscheuer, U. T., Huisman, G. W., Kazlauskas, R. J., Lutz, S., Moore, J. C., & Robins, K. (2012). Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature*, 485(7397), 185-194. doi:10.1038/nature11117
- Cech, T. R., & Bass, B. L. (1986). Biological catalysis by RNA. *Annu Rev Biochem*, 55, 599-629. doi:10.1146/annurev.bi.55.070186.003123
- Chen, D. H., Baker, M. L., Hryc, C. F., DiMaio, F., Jakana, J., Wu, W., . . . Chiu, W. (2011). Structural basis for scaffolding-mediated assembly and maturation of a dsDNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(4), 1355-1360. doi:10.1073/pnas.1015739108
- Cirino, P. C. (2004). *Laboratory evolution of cytochrome P450 peroxygenase activity*. (Ph.D.), California Institute of Technology. Retrieved from <http://resolver.caltech.edu/CaltechETD:etd-06062003-164310> (2469)
- Cirino, P. C., & Arnold, F. H. (2002). Regioselectivity and Activity of Cytochrome P450 BM-3 and Mutant F87A in Reactions Driven by Hydrogen Peroxide. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 344(9), 932-937. doi:10.1002/1615-4169(200210)344:9<932::aid-adsc932>3.0.co;2-m
- Cornish-Bowden, A. (1995). *Fundamentals of enzyme kinetics* (Rev. ed ed.). London: Portland.
- Dika, C., Duval, J. F., Ly-Chatain, H. M., Merlin, C., & Gantzer, C. (2011). Impact of internal RNA on aggregation and electrokinetics of viruses: comparison between MS2 phage and corresponding virus-like particles. *Appl Environ Microbiol*, 77(14), 4939-4948. doi:10.1128/AEM.00407-11
- Fiedler, J. D., Brown, S. D., Lau, J. L., & Finn, M. G. (2010). RNA-directed packaging of enzymes within virus-like particles. *Angew Chem Int Ed Engl*, 49(50), 9648-9651. doi:10.1002/anie.201005243
- Fields, B. N., Knipe, D. M., & Howley, P. M. (2013). *Bacteriophages* Fields virology (6th ed., pp. xx, 2456, l-2482 p.). Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins,. Retrieved from <http://kcl.ebib.com/patron/FullRecord.aspx?p=2031644>.
- Flenniken, M. L., Uchida, M., Liepold, L. O., Kang, S., Young, M. J., & Douglas, T. (2009). A Library of Protein Cage Architectures as Nanomaterials. In M. Manchester & N. F. Steinmetz (Eds.), *Viruses and Nanotechnology* (pp. 71-93). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Fuller, M. T., & King, J. (1982). Assembly in vitro of bacteriophage P22 procapsids from purified coat and scaffolding subunits. *J Mol Biol*, 156(3), 633-665. doi:10.1016/0022-2836(82)90270-4
- Grgacic, E. V., & Anderson, D. A. (2006). Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods*, 40(1), 60-65. doi:10.1016/j.ymeth.2006.07.018
- Kang, S., Uchida, M., O'Neil, A., Li, R., Prevelige, P. E., & Douglas, T. (2010). Implementation of p22 viral capsids as nanoplatfoms. *Biomacromolecules*, 11(10), 2804-2809. doi:10.1021/bm100877q
- Katen, S., & Zlotnick, A. (2009). The Thermodynamics of Virus Capsid Assembly *Methods in Enzymology* (Vol. 455, pp. 395-417): Academic Press.

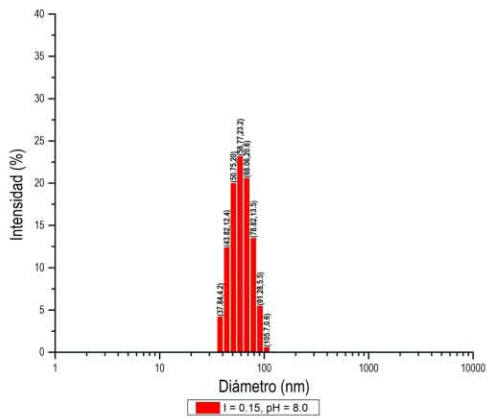
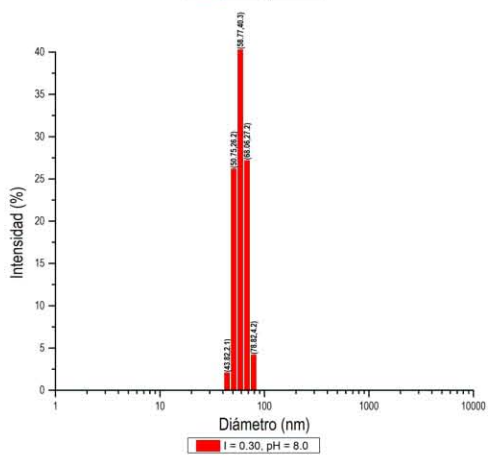
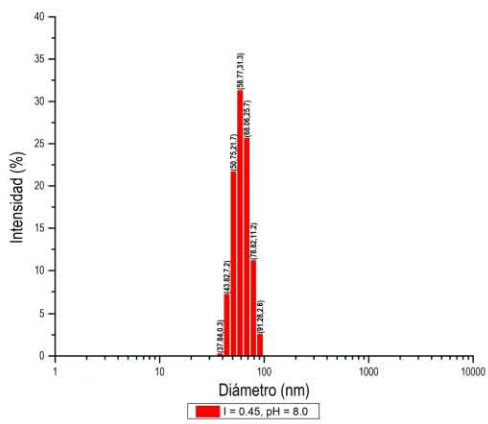
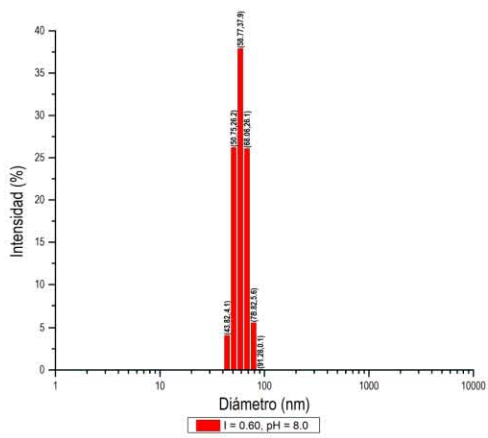
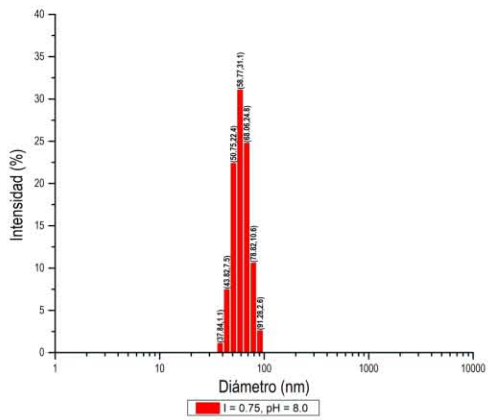
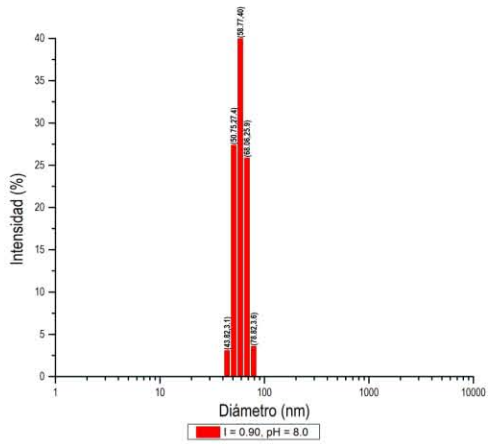
- King, J., & Casjens, S. (1974). Catalytic head assembling protein in virus morphogenesis. *Nature*, 251(5471), 112-119.
- King, J., Hall, C., & Casjens, S. (1978). Control of the synthesis of phage p22 scaffolding protein is coupled to capsid assembly. *Cell*, 15(2), 551-560. doi:10.1016/0092-8674(78)90023-5
- Lagasse, H. A., Alexaki, A., Simhadri, V. L., Katagiri, N. H., Jankowski, W., Sauna, Z. E., & Kimchi-Sarfaty, C. (2017). Recent advances in (therapeutic protein) drug development. *F1000Res*, 6, 113. doi:10.12688/f1000research.9970.1
- Leader, B., Baca, Q. J., & Golan, D. E. (2008). Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nat Rev Drug Discov*, 7(1), 21-39. doi:10.1038/nrd2399
- Lepault, J., Petitpas, I., Erk, I., Navaza, J., Bigot, D., Dona, M., . . . Rey, F. A. (2001). Structural polymorphism of the major capsid protein of rotavirus. *EMBO J*, 20(7), 1498-1507. doi:10.1093/emboj/20.7.1498
- Lewis, G. N., & Randall, M. (1921). The Activity Coefficient of Strong Electrolytes.1. *Journal of the American Chemical Society*, 43(5), 1112-1154. doi:10.1021/ja01438a014
- Liu, B., Poolman, B., & Boersma, A. J. (2017). Ionic Strength Sensing in Living Cells. *ACS Chem Biol*. doi:10.1021/acscchembio.7b00348
- Lucon, J., Qazi, S., Uchida, M., Bedwell, G. J., LaFrance, B., Prevelige, P. E., Jr., & Douglas, T. (2012). Use of the interior cavity of the P22 capsid for site-specific initiation of atom-transfer radical polymerization with high-density cargo loading. *Nat Chem*, 4(10), 781-788. doi:10.1038/nchem.1442
- Mehta, M. D. (2016). Nanoscience and Nanotechnology: Assessing the Nature of Innovation in These Fields. *Bulletin of Science, Technology & Society*, 22(4), 269-273. doi:10.1177/027046760202200402
- Mertens, B. S., & Velev, O. D. (2015). Characterization and control of surfactant-mediated Norovirus interactions. *Soft Matter*, 11(44), 8621-8631. doi:10.1039/c5sm01778e
- Miguel-Alejandro, T.-M. (2015). *Funcionalización y direccionamiento de partículas tipo virus del bacteriófago P22 con actividad citocromo P450*. (Maestro en Ciencias), Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
- Molineux, I. J. (2001). No syringes please, ejection of phage T7 DNA from the virion is enzyme driven. *Molecular Microbiology*, 40(1), 1-8. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02357.x
- Nagamune, T. (2017). Biomolecular engineering for nanobio/bionanotechnology. *Nano Converge*, 4(1), 9. doi:10.1186/s40580-017-0103-4
- Parent, K. N., Gilcrease, E. B., Casjens, S. R., & Baker, T. S. (2012). Structural evolution of the P22-like phages: comparison of Sf6 and P22 procapsid and virion architectures. *Virology*, 427(2), 177-188. doi:10.1016/j.virol.2012.01.040
- Parent, K. N., Khayat, R., Tu, L. H., Suhanovsky, M. M., Cortines, J. R., Teschke, C. M., . . . Baker, T. S. (2010). P22 coat protein structures reveal a novel mechanism for capsid maturation: stability without auxiliary proteins or chemical crosslinks. *Structure*, 18(3), 390-401. doi:10.1016/j.str.2009.12.014
- Parker, M. H., Casjens, S., & Prevelige, P. E., Jr. (1998). Functional domains of bacteriophage P22 scaffolding protein. *J Mol Biol*, 281(1), 69-79. doi:10.1006/jmbi.1998.1917
- Parker, M. H., Jablonsky, M., Casjens, S., Sampson, L., Krishna, N. R., & Prevelige, P. E., Jr. (1997). Cloning, purification, and preliminary characterization by circular dichroism and NMR of a carboxyl-terminal domain of the bacteriophage P22 scaffolding protein. *Protein Sci*, 6(7), 1583-1586. doi:10.1002/pro.5560060722
- Parker, M. H., Stafford, W. F., 3rd, & Prevelige, P. E., Jr. (1997). Bacteriophage P22 scaffolding protein forms oligomers in solution. *J Mol Biol*, 268(3), 655-665. doi:10.1006/jmbi.1997.0995

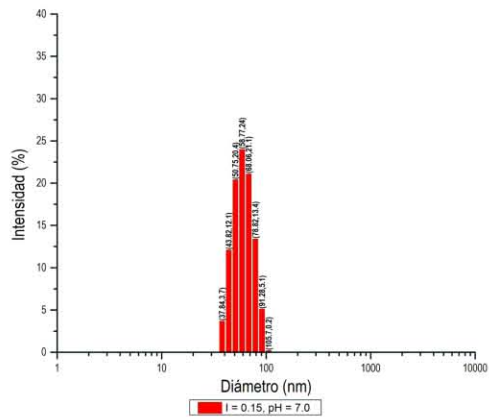
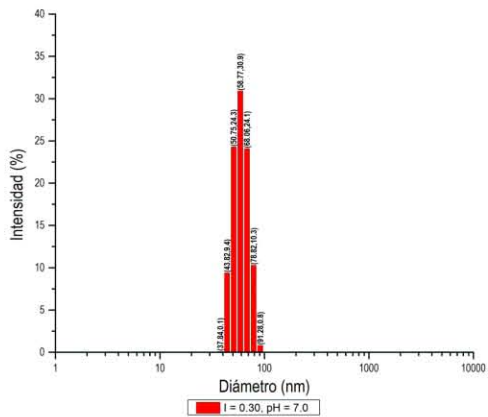
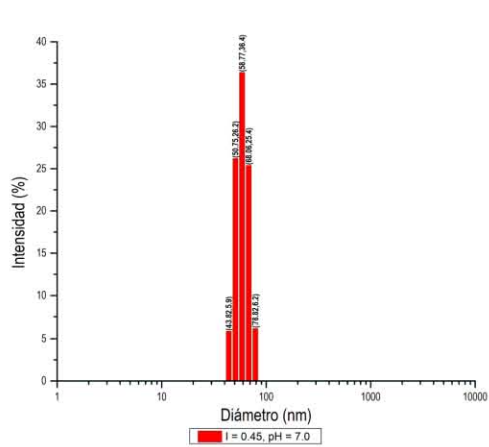
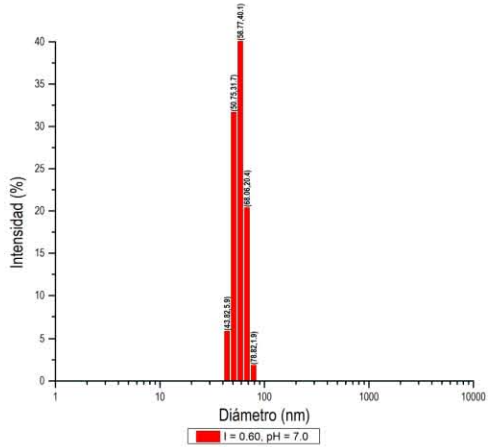
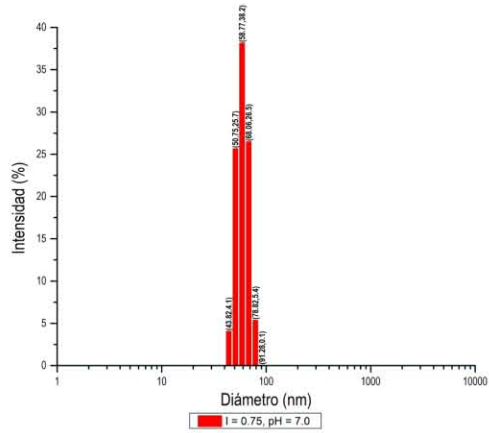
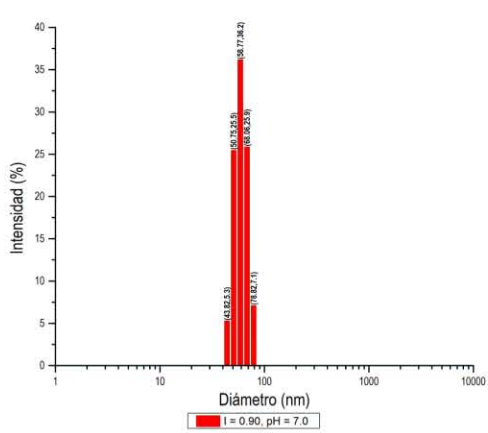
- Patterson, D. P., Prevelige, P. E., & Douglas, T. (2012). Nanoreactors by Programmed Enzyme Encapsulation Inside the Capsid of the Bacteriophage P22. *ACS Nano*, 6(6), 5000-5009. doi:10.1021/nn300545z
- Patterson, D. P., Schwarz, B., El-Boubbou, K., van der Oost, J., Prevelige, P. E., & Douglas, T. (2012). Virus-like particle nanoreactors: programmed encapsulation of the thermostable CelB glycosidase inside the P22 capsid. *Soft Matter*, 8(39), 10158. doi:10.1039/c2sm26485d
- Patterson, D. P., Schwarz, B., Waters, R. S., Gedeon, T., & Douglas, T. (2014). Encapsulation of an enzyme cascade within the bacteriophage P22 virus-like particle. *ACS Chem Biol*, 9(2), 359-365. doi:10.1021/cb4006529
- Sanchez-Sanchez, L., Tapia-Moreno, A., Juarez-Moreno, K., Patterson, D. P., Cadena-Nava, R. D., Douglas, T., & Vazquez-Duhalt, R. (2015). Design of a VLP-nanovehicle for CYP450 enzymatic activity delivery. *J Nanobiotechnology*, 13, 66. doi:10.1186/s12951-015-0127-z
- Sánchez-Sánchez, L. P. (2014). *Diseño y caracterización de partículas pseudovirales biocatalíticas*. (Thesis), Universidad Nacional Autónoma de México. Retrieved from <http://132.248.9.195/ptd2014/mayo/402049474/index.html> Available from EBSCOhost cat02029a database.
- Sastre de Vicente, M. E. (2004). The Concept of Ionic Strength Eighty Years after Its Introduction in Chemistry. *Journal of Chemical Education*, 81(5), 750. doi:10.1021/ed081p750
- Scopes, R. K. (1994). *Protein purification : principles and practice* (3rd ed.). New York: Springer-Verlag.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. K. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6(2), 174. doi:10.1007/s13205-016-0485-8
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2010). *Introduction to modern liquid chromatography* (3rd ed.). Hoboken, N.J.: Wiley.
- Sun, Y., Parker, M. H., Weigele, P., Casjens, S., Prevelige, P. E., Jr., & Krishna, N. R. (2000). Structure of the coat protein-binding domain of the scaffolding protein from a double-stranded DNA virus. *J Mol Biol*, 297(5), 1195-1202. doi:10.1006/jmbi.2000.3620
- Tang, J., Lee, K. K., Bothner, B., Baker, T. S., Yeager, M., & Johnson, J. E. (2009). Dynamics and stability in maturation of a T=4 virus. *J Mol Biol*, 392(3), 803-812. doi:10.1016/j.jmb.2009.07.038
- Thuman-Commike, P. A., Greene, B., Malinski, J. A., King, J., & Chiu, W. (1998). Role of the scaffolding protein in P22 procapsid size determination suggested by T = 4 and T = 7 procapsid structures. *Biophys J*, 74(1), 559-568. doi:10.1016/S0006-3495(98)77814-2
- Tipton, K., & Boyce, S. (2000). History of the enzyme nomenclature system. *Bioinformatics*, 16(1), 34-40.
- Usmani, S. S., Bedi, G., Samuel, J. S., Singh, S., Kalra, S., Kumar, P., . . . Raghava, G. P. S. (2017). THPdb: Database of FDA-approved peptide and protein therapeutics. *PLoS ONE*, 12(7), e0181748. doi:10.1371/journal.pone.0181748
- Zandi, R., Reguera, D., Bruinsma, R. F., Gelbart, W. M., & Rudnick, J. (2004). Origin of icosahedral symmetry in viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(44), 15556-15560. doi:10.1073/pnas.0405844101
- Zeltins, A. (2013). Construction and characterization of virus-like particles: a review. *Mol Biotechnol*, 53(1), 92-107. doi:10.1007/s12033-012-9598-4

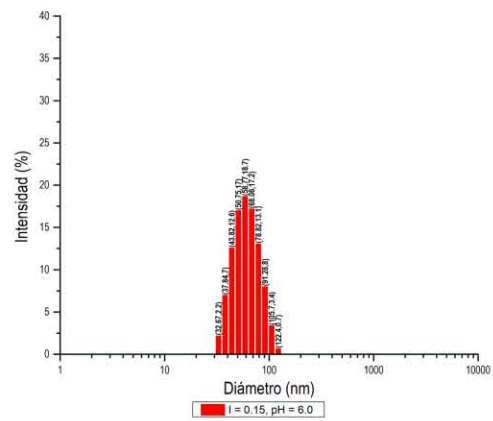
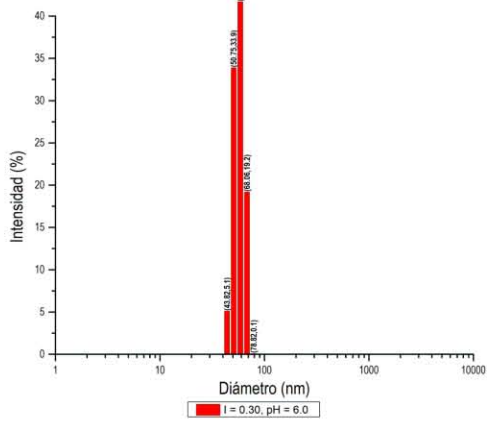
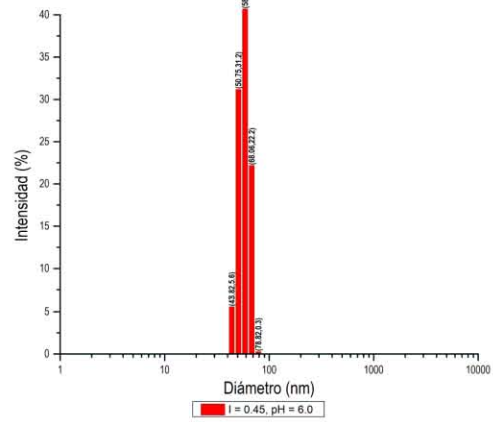
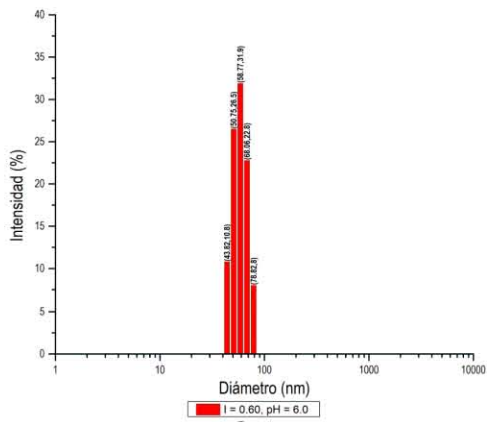
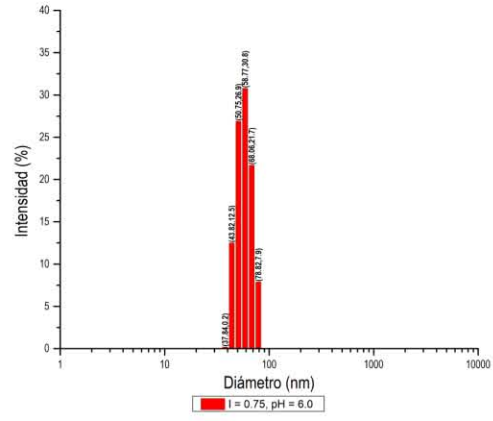
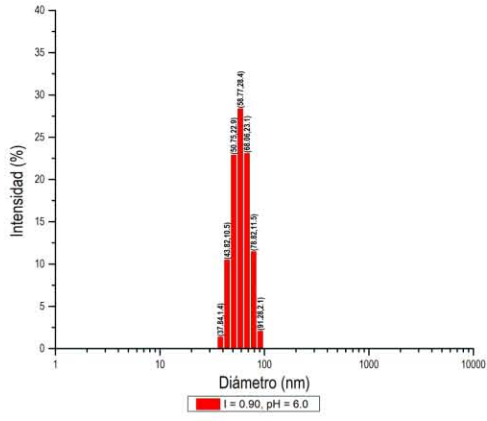
Apéndice

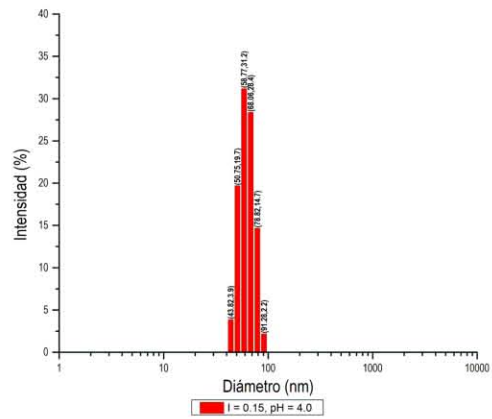
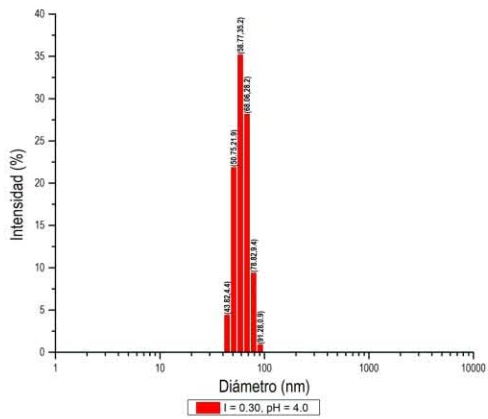
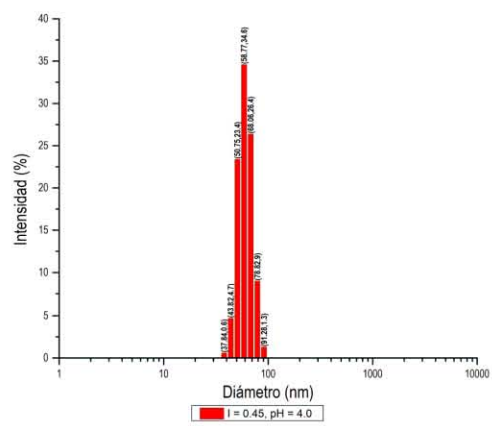
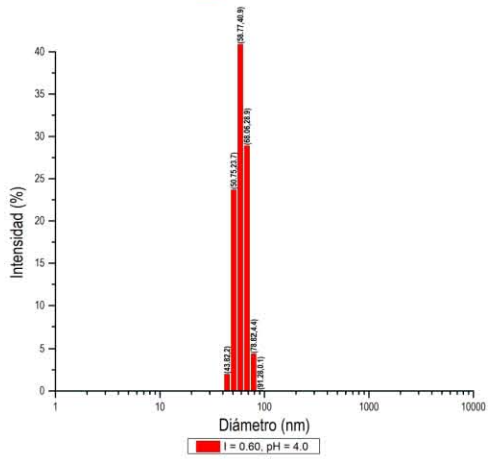
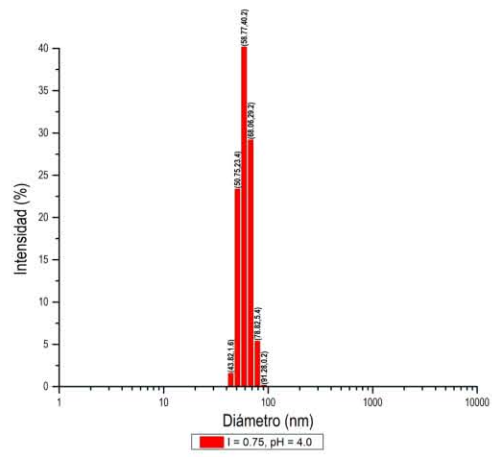
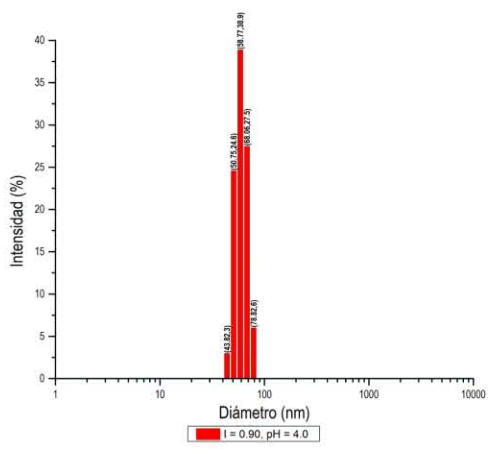
1. Gráficas de intensidad de las mediciones de dispersión dinámica de luz











2. Código utilizado para el análisis de varianza (ANOVA) de un sentido en el software MATLAB R2017a

```
close all
clc
clear all
%%
%Valores de medias muestrales y desviaciones estándar
m=
[57.63,58.33,58.41,58.31,59.69,59.21,58.12,59.41,58.39,5
9.41,58.74,58.33,58.43,58.55,56.57,58.19,58.53,58.44,58.
27,56.82,57.38,56.72,56.39,57.41,64.39,59.46,59.05,59.57
,59.90,63.24,59.01,59.43,59.06,59.12,59.77,63.46]
s =
[9.330,6.743,9.501,7.849,7.357,8.850,8.013,12.04,8.386,1
1.49,6.658,9.088,8.671,7.352,7.498,7.042,13.78,7.626,13.
61,11.22,12.86,6.109,4.453,16.15,25.78,8.002,6.381,8.097
,12.22,14.53,7.582,7.510,7.338,9.461,9.628,21.80]

%%
% Número de muestras o tratamientos
I = numel(m);
%%
% Tamaños de muestra u observaciones
% J1,...,JI      % Seria 5
Ji=5
% Número total en todas las muestras combinadas (N) =
J1+...+JI
N = 5*I
%%
% Hipótesis nula H0= m1=m2=...=mI
%%
%Gran Media Muestral

for i = 1:I
    Suma(i) = Ji*m(i);
end
Suma = sum(Suma);
M = Suma / (I*Ji)

%%
```

```

%Suma de los cuadrados del tratamiento (SSTr)

for i= 1:1:I
    STr(i) = Ji*((m(i)-M)^2);
end
SSTr = sum(STr)

%%
%Suma de los cuadrados del error (SSE)

for i= 1:1:I
    SE(i) = (Ji-1)*s(i)^2;
end
SSE = sum(SE)

%%
% Media cuadrática de tratamiento
MSTr = SSTr/(I-1)

%%
% Media cuadrática del error
MSE = SSE/(N-I)

%%
% Estadístico de prueba con distribución F con I-1 y N-I
grados de libertad (F_I-1,N-I)
F = MSTr/MSE
P=1-fcdf(F,I-1,N-I) %P-valor

```