



Memoria del 46.º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

## Parvovirus B19: autoensamble y potencial para la construcción de nanobiomateriales.

Parvovirus B19: self-assembly and potential for the construction of nanobiomaterials.

Santillán Uribe, Hugo César<sup>1</sup> y Bustos Jaimes, Ismael<sup>1\*</sup>

1. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM

\*Correspondencia. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM, Avenida Universidad 3000, Col. Copilco, Coyoacán, CDMX, CP 04510 Tel. +52 (55) 5623-2260, [ismaelb@unam.mx](mailto:ismaelb@unam.mx)

### Resumen

Las partículas tipo virus (VLPs) son ensamblajes moleculares de todos o algunos componentes estructurales de los virus, dejando fuera al material genético. Esto hace que las VLPs conserven la mayoría de las propiedades de estabilidad y reconocimiento de los virus, sin ser infectivas. Las VLPs han sido utilizadas como vacunas con buenos resultados. No obstante, sus aplicaciones pueden ir más allá de las vacunas, y se han usado como andamios para la construcción de nuevos biomateriales mediante la conjugación de moléculas de diversa naturaleza en sus superficies externa e interna. Las VLPs del parvovirus B19 (B19V) se pueden ensamblar *in vivo* o *in vitro*, y su potencial tecnológico no ha sido explotado aún. La propia naturaleza de este virus permite la presentación de péptidos en su superficie mediante fusión genética. Sin embargo, el uso esta estrategia no aprovecha completamente su polivalencia estructural. En este trabajo se presentan algunas estrategias que se han abordado para provechar la polivalencia de las VLPs de B19V, y las formas en que se ha logrado la presentación simultánea de más de un elemento heterólogo en su superficie.

### Abstract

Virus-like particles (VLPs) are molecular assemblies of all or some of the structural components of viruses, not including their genetic material. Thus, VLPs keep most of their stability and recognition properties but are noninfective. VLPs have been used as vaccines showing good results. Nevertheless, applications for VLPs could go beyond vaccines, and have been used as scaffolds for the construction of new biomaterials through the conjugation of miscellaneous molecules on their external and internal surfaces. Parvovirus B19 (B19V) VLPs can be assembled either *in vivo* or *in vitro*, and its technological potential has not been exploited yet. The own nature of B19V allows the display of peptides on its surface through genetic fusion. However, this approach does not take full advantage of the structural polyvalence of the capsid. Herein, we present some strategies used to make the most of the polyvalence of B19V VLPs, and how it has been possible to display more than one heterologous peptide on its surface.

**Palabras clave:** Nanobiomateriales, parvovirus B19, bioquímica supramolecular, biología sintética.

**Key words:** Nanobiomaterials, parvovirus B19, supramolecular biochemistry, synthetic biology

## Introducción

La bionanotecnología se encarga de la construcción de nanomateriales a partir de elementos biológicos. Los virus son, naturalmente, bionanopartículas optimizadas para proteger y transportar ácidos nucleicos, así como para dar todas las facilidades para su entrega en células específicas que permitan su replicación. Además de su tamaño en escala “nano”, los virus presentan otras propiedades de gran interés en la ciencia de los materiales, como son su monodispersidad y polivalencia. Esto es, su tamaño es homogéneo y, al estar compuestos de unidades estructurales repetitivas, sus grupos químicos se repiten y se encuentran distribuidos de manera precisa en la superficie de los viriones. La monodispersidad de los nanomateriales para uso biológico es de gran importancia, ya que el tamaño determina su comportamiento; por ejemplo, la estabilidad química, estabilidad coloidal, ruta de ingreso a la célula y eficiencia de entrega, son propiedades fuertemente dependientes del tamaño. Por su parte, la polivalencia permite la presentación de múltiples grupos idénticos, potencializando sus propiedades de reconocimiento molecular o, para fines tecnológicos, aumentando las posibilidades de presentación de péptidos o conjugación de moléculas de interés [1].

Si bien estas propiedades de los virus los hacen sumamente atractivos, su infectividad ha sido una preocupación permanente. La producción de virus, muchos de ellos patógenos, puede ser un proceso de alto riesgo que se puede evitar al utilizar virus que no infecten a humanos. Esto, sin embargo, puede implicar que se pierdan propiedades de interés como su tropismo. Para reducir los riesgos del trabajo con virus y tratar de conservar sus propiedades, se ha investigado el uso de partículas tipo virus (*virus-like particles*, VLPs) [2]. Estas partículas se generan mediante la expresión heteróloga de las proteínas estructurales de los virus, que se autoensamblan para formar estructuras huecas casi idénticas a los virus. Al encontrarse en un sistema heterólogo, las VLPs se ensamblan en un ambiente en el que no se reproduce el material genético del virus, por lo tanto, este no participa en el autoensamble, dando por resultado que las VLPs no sean infecciosas ya que no pueden completar su ciclo de replicación. En contraste, estas partículas retienen prácticamente todas las propiedades estructurales del virión, como el reconocimiento por receptores celulares y sus propiedades inmunogénicas [3]. Esto último ha servido para producir vacunas que actualmente se encuentran en el mercado, como aquellas contra el cáncer cérvico-uterino basadas en VLPs del virus del

papiloma humano (HPV), Carvarix® y Gardasil® [4, 5].

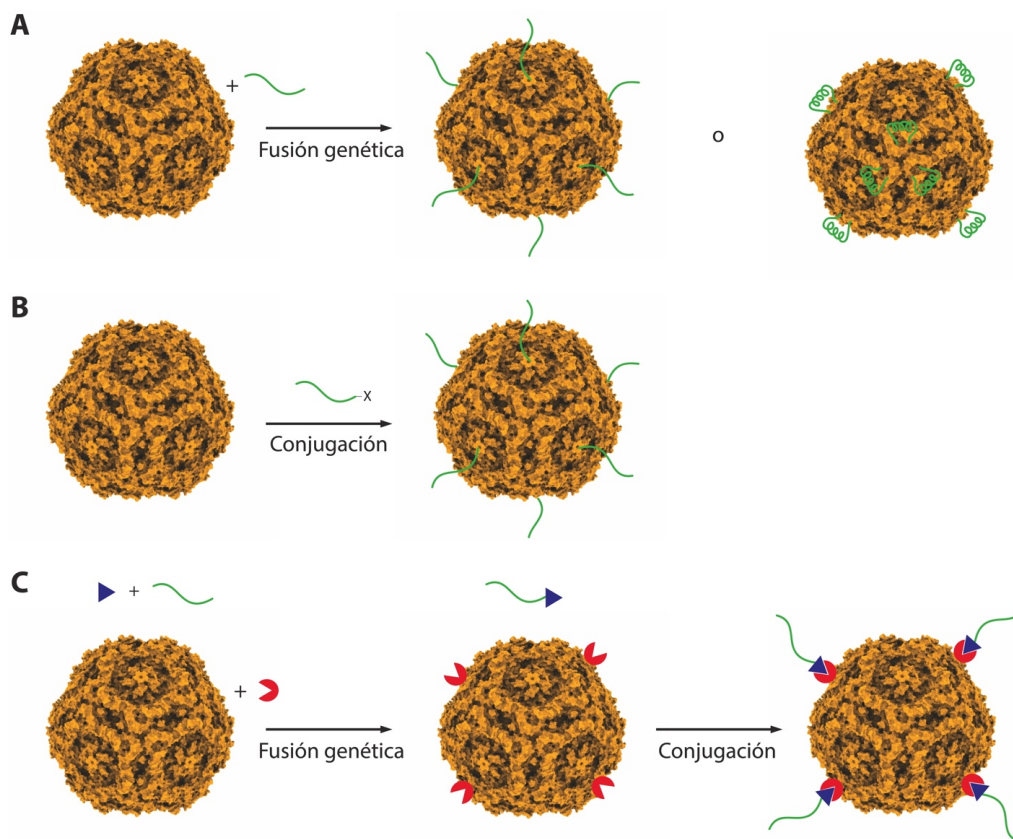
La presentación de péptidos en VLPs se hace generalmente mediante la fusión genética entre la secuencia de DNA que codifica para el péptido de interés con la secuencia de DNA correspondiente al gen estructural al cual se desea fusionar el péptido heterólogo. De esta manera, las proteínas generadas contendrán el péptido heterólogo unido covalentemente [6]. Muchas consideraciones se deben tomar para que la modificación de la proteína estructural del virus mantenga su competencia de autoensamble para formar VLPs. Evidentemente, es necesario predecir la localización del péptido heterólogo en la partícula ensamblada. Comúnmente se utilizan los extremos amino o carboxilo terminales de las proteínas cuando se sabe que estos quedan expuestos en la superficie. Sin embargo, no es muy común que esto suceda. En tales casos se puede recurrir a la modificación de asas superficiales [3]. Ambas estrategias tienen pros y contras, e implican retos tecnológicos que se debe abordar caso por caso.

Una segunda aproximación a la presentación de péptidos en la superficie de VLPs radica en su conjugación. Dicha conjugación puede realizarse mediante reacciones con los grupos químicos provistos por los residuos de aminoácido de las VLPs y la molécula que se desea conjugar, o bien a través de la modificación de las proteínas para generar grupos químicos cuya capacidad de reacción sea ortogonal, es decir mutuamente exclusiva. Esta manipulación de las proteínas, si bien es muy elegante, no es aplicable a un gran número de proteínas cuyas propiedades coloidales pueden verse comprometidas al cambiar las condiciones en que éstas son solubles. Otra vertiente de la conjugación utiliza una aproximación mixta, en la que por fusión genética se unen fragmentos de proteína a las proteínas estructurales de las VLPs y a una contraparte que se desea conjugar. Ambas partes son ortogonales entre sí, de modo que una vez que las VLPs están formadas, se mezclan las contrapartes y ocurre la reacción de manera exclusiva para generar un conjugado biológico (Fig. 1) [7, 8].

La conjugación de péptidos u otras moléculas a las VLPs ha permitido la construcción de bionanomateriales funcionales. Los grupos reactivos que se aprovechan para la construcción de sistemas utilizando estas partículas son provistos por lisinas, tirosinas, grupos carboxilo y cisteínas expuestas, ya sea que se encuentren naturalmente en los virus o se pueden introducir mediante ingeniería genética [9]. Con esta idea, Szuchmacher y col. [10] usaron al

virus del mosaico del caupí (CMV) para generar tres patrones tridimensionales distintos de partículas de oro. La cápside del CMV está compuesta por 60 copias idénticas de proteína. La subunidad no presenta cisteínas que al plegarse se encuentren expuestas en la superficie, requeridas para llevar a cabo la adición de las partículas de oro, por lo que

mediante ingeniería genética se hicieron varias mutaciones puntuales para generar la polivalencia necesaria para los distintos diseños. De este modo fue posible incorporar partículas de oro con precisión en escala nanométrica.



**Figura 1. Estrategias de presentación de péptidos o proteínas en la superficie de virus o VLPs.** (A) Fusión de los genes que codifican para el péptido que se desea presentar, ya sea en uno de los extremos terminales o insertado en un asa superficial. (B) Por conjugación química, en la que un grupo químico en el péptido reacciona de manera específica con un grupo en la superficie de la cápside. (C) Por fusión genética de proteínas que luego pueden unirse entre ellas

Otra aplicación atractiva para las VLPs, se presenta en el campo de la imagen para investigación básica, diagnóstico y tratamiento [11]. Las VLPs pueden entregar reactivos de imagen y fármacos a sitios precisos, generando imágenes con alto contraste y permitiendo el tratamiento con dosis más concentradas de fármacos en sitios específicos, minimizando al mismo tiempo los efectos adversos. Las VLPs pueden ser modificadas con fluoróforos orgánicos para imágenes ópticas, con complejos de gadolinio (Gd) para imágenes de resonancia magnética nuclear, y con puntos cuánticos (QDs) o nanopartículas metálicas para la detección mediante métodos espectroscópicos [12].

En nuestro grupo nos hemos dado a la tarea de investigar el proceso de ensamble *in vitro* de VLPs provenientes del parvovirus B19 (B19V), así como su potencial como bionanomaterial para aplicaciones tecnológicas.

### Parvovirus B19

El B19V es un virus patógeno que causa múltiples enfermedades en los humanos. Cuando este virus infecta a mujeres embarazadas puede ocasionar hidropesía fetal, aborto espontáneo e inclusive muerte intrauterina. También es responsable de causar el eritema infeccioso conocido como “*quinta enfermedad*” en la población infantil y, en los

adultos, es común que la infección esté asociada a enfermedades reumáticas y a distintos tipos de anemia.

Los viriones del B19V poseen un genoma constituido por una molécula de DNA monocatenario lineal que codifica para la producción de una proteína no estructural (NS1), dos proteínas estructurales (VP1 y VP2) y algunas otras proteínas cuya función no está completamente elucidada. Este material genético se encuentra al interior de cápsides que miden entre 18 y 25 nm de diámetro. Cada cápside posee una distribución icosaédrica y está formada por la asociación de 60 copias de las proteínas estructurales. Del total de copias, aproximadamente el 5% corresponde a la proteína VP1 y el 95% restante a la proteína VP2. Ambas proteínas poseen identidad en su secuencia de aminoácidos excepto por un fragmento ubicado en el extremo N-terminal conocido como "región única de VP1" (VP1u) [13].

### Partículas tipo virus de parvovirus B19

Existen diversas estrategias para obtener partículas tipo virus de B19V. Una de ellas se lleva a cabo *in vitro*, para lo cual es necesario producir y purificar las proteínas que participan en la formación de las VLPs. Sánchez-Rodríguez y col. [14] trabajaron para expresar y purificar la proteína VP2 a partir de cultivos celulares de *E. coli*. A pesar de que VP2 tiende a la formación de cuerpos de inclusión, es posible recuperarla mediante un proceso de purificación bajo condiciones desnaturizantes. Posteriormente, una vez que se retira el agente desnaturizante, VP2 es capaz de replegarse, es decir, recuperar su estructura terciaria y autoensamblarse bajo condiciones controladas a través de un proceso de oligomerización. La energética de este proceso indica que se encuentra favorecida la formación de oligómeros de tres monómeros de proteína (capsómeros) y que veinte de estos capsómeros se asocian para formar una VLP.

Las partículas tipo virus poseen características que son sumamente atractivas para diversos fines. Sin embargo, también es cierto que su manipulación implica numerosos retos. Trabajar con oligómeros de tan elevada complejidad suele derivar en problemas de estabilidad coloidal y las VLPs del B19V no son la excepción. Para combatir esta situación, Sánchez-Rodríguez y col. [15] demostraron que es posible incrementar significativamente la estabilidad coloidal de estas partículas al incorporar L-Arginina como chaperona química durante la etapa donde ocurre su formación. Esta estrategia ha mejorado el rendimiento en la obtención de estas partículas y se

han abierto muchas puertas para el aprovechamiento y desarrollo de estos y otros nuevos materiales.

### Presentación de péptidos heterólogos en superficie

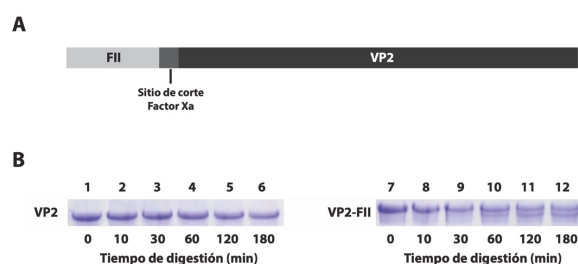
La posibilidad de presentar péptidos en la superficie de las VLPs de B19V mediante fusiones en el extremo N-terminal de la proteína VP2 o VP1 ya ha sido abordado [16]. Ogasawara y col. [17] reportaron la presentación en VLPs de B19V, de un antígeno que genera protección contra el ántrax. En ese trabajo fusionaron péptidos derivados de la toxina del ántrax al extremo N-terminal de la proteína VP2, y coexpresaron las quimeras con las proteínas VP1 y VP2 en células Sf9. Las VLPs producidas tuvieron la capacidad de generar anticuerpos que resultaron protectores contra la toxina del ántrax en ratones BALB/c. Usando una estrategia similar, se fusionaron epítomos específicos del dominio BIII de la glicoproteína E del dengue 2 a la proteína VP2. Muchas de sus quimeras, ensambladas en VLPs, indujeron una fuerte respuesta inmune en ratones, con anticuerpos neutralizantes del virus del dengue 2 [18].

La aproximación de ensamble *in vitro* nos permite utilizar proteínas quiméricas para el ensamble, además de probar combinaciones entre quimeras y VP2. De este modo, si el fragmento heterólogo adicionado en el extremo N-terminal tuviese impacto sobre el autoensamble de la quimera, la presencia de VP2 podría reducir las restricciones estructurales impuestas por el fragmento heterólogo. En el caso del ensamble *in vivo*, se ha observado que la proteína VP1 no permite la formación de VLPs, lo cual fue atribuido a un efecto estérico del fragmento VP1u alrededor del eje de simetría de orden 5 [19].

Morán-García y col. [20] diseñaron dos péptidos pertenecientes a las regiones antigénicas II y IV de la proteína de fusión (F) del virus sincicial respiratorio (RSV). Dichos péptidos fueron fusionados genéticamente en el extremo N-terminal de la proteína VP2 del B19V. Idealmente dichos péptidos, presentados sobre VLPs, podrían inducir una respuesta inmune contra el RSV al ser inoculadas en un modelo murino. Las proteínas recombinantes fueron expresadas en *E. coli*, se purificaron y usaron para ensamblar VLPs. La caracterización de estas partículas mostró que el extremo heterólogo no impactaba de manera negativa al autoensamble de las quimeras en VLPs.

En el caso de VP1u muchos estudios indican que este dominio se encuentra dentro de la cápside antes de la unión del virión a su receptor celular. El

autoensamblable de las quimeras en VLPs no implica que los péptidos se encuentren en la superficie de las mismas, sino que podrían mantenerse en su interior. Para determinar si el fragmento heterólogo se encontraba en la superficie de las VLPs o en su interior, durante el diseño se incluyó un sitio de corte para la proteasa factor Xa (Fig. 2A), de modo que, si el extremo queda en la superficie de la VLP, la proteasa podría cortarlo. El análisis de la proteólisis de VLPs formadas con VP2 mostró que estas partículas no son cortadas por la proteasa. En contraste, las VLPs formadas con la proteína quimérica fueron parcialmente cortadas, formando una banda del tamaño esperado para la forma trunca de la quimera (casi idéntico al de VP2) (Fig. 2B). El análisis por densitometría de las bandas sugiere solo el 26% de la proteína quimérica fue digerida. Este porcentaje implica que, de las 60 subunidades de la quimera, solo 21 tienen el extremo N-terminal expuesto en la superficie. Otra prueba de que el péptido se encuentra en la superficie se hizo mediante dot-blot, en la que se depositaron en una membrana VLPs formadas exclusivamente con la quimera FII-VP2. Estas quimeras se hicieron reaccionar con el anticuerpo comercial Palivizumab®, un anticuerpo monoclonal dirigido contra el epítipo II del RSV, el mismo epítipo que lleva la quimera FII-VP2. El resultado fue positivo, lo que implica que el epítipo II se encuentra expuesto, al menos parcialmente.



**Figura 2. Demostración de la presencia de el factor FII en la superficie de las VLPs.** (A) Esquema de la quimera compuesta por la región inmunogénica FII seguida por una secuencia de corte para la proteasa factor Xa y finalmente la secuencia de la proteína VP2. (B) Análisis por SDS-PAGE de la digestión de VP2 (carriles 1-8) y FII-VP2 (carriles 9-16) por la proteasa factor Xa a diferentes tiempos a 4 °C en PBS pH 7.4.

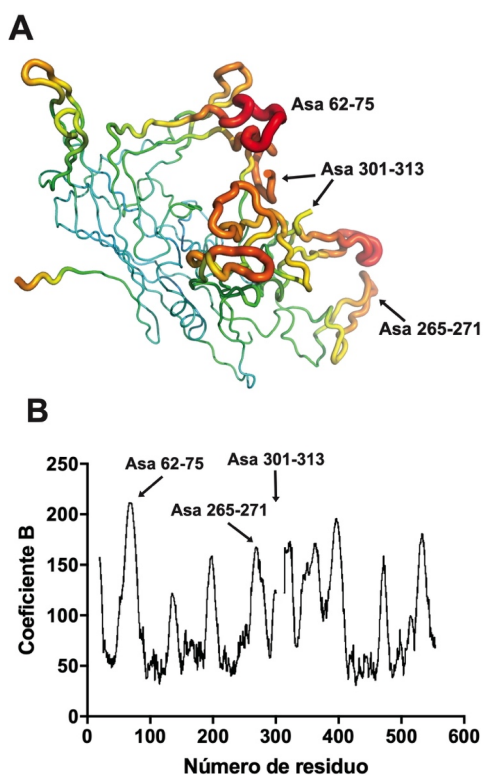
En otro trabajo, se intentó utilizar la presentación de péptidos en la superficie de las VLPs de B19V para generar tropismo hacia células que no son la diana natural del virus B19V. En ese trabajo, se fusionó genéticamente el péptido preS<sub>21-47</sub> del virus de la hepatitis B (HBV) [21] al extremo N-terminal de la proteína VP2. El péptido preS<sub>21-47</sub> es parte de la proteína L de este virus y es responsable del reconocimiento entre el HBV y los hepatocitos.

Previamente, el grupo de Yamada [22] demostró que VLPs derivadas de la proteína L del HBV pueden ser usadas para transfectar genes heterólogos de manera específica en hepatocitos humanos, tanto en cultivos *in vitro* como en un modelo de xenotrasplante de ratón. El péptido PreS<sub>21-47</sub> se une de manera específica a una proteína de la membrana plasmática de células de hepatocarcinoma HepG2, la llamada proteína de unión a HBV (HBV-BP), que se ha postulado como el receptor celular del HBV [23]. En nuestro caso, la fusión preS<sub>21-47</sub>-VP2 se expresó en *E. coli*, se purificó por afinidad a iones metálicos en condiciones desnaturalizantes y, finalmente, se replegó para ver si conservaba su competencia para formar VLPs. Nuestros resultados por dispersión dinámica de luz (DLS), microscopía de fuerza atómica (AFM) y centrifugación isopícnica indicaron la presencia de VLPs, las cuales fueron marcadas con bimano para hacerlas fluorescentes. Las VLPs fluorescentes fueron utilizadas para marcar células HepG2, usando como control a las mismas VLPs de B19V ensambladas a partir de VP2, marcadas del mismo modo. Los resultados mostraron que las células que fueron tratadas con las VLPs formadas con preS<sub>21-47</sub> fueron penetradas por las partículas, de acuerdo a su fluorescencia, mientras que las VLPs ensambladas con VP2 presentaron una fluorescencia similar al de las células que nunca fueron tratadas con VLPs marcadas. Esto implica que el péptido preS<sub>21-47</sub> fue efectivamente presentado en la superficie, permitiendo que interactuara con el receptor HBV-BP, aunque no sabemos con qué frecuencia ocurre esta presentación.

Los resultados presentados hasta aquí evidencian que se pueden presentar péptidos en la superficie de VLPs de B19V mediante su fusión genética en el extremo N-terminal de VP2. Sin embargo, la polivalencia de esta presentación parece ser mucho menor a la que potencialmente se podría obtener en una partícula formada de 60 subunidades idénticas. Tomando esto en consideración, decidimos hacer una segunda aproximación que no implicara un extremo que puede o no aparecer en la superficie de las partículas. Un análisis estructural de la proteína VP2 ensamblada en VLPs (PDB 1S58) nos permitió explorar la posibilidad de insertar péptido en las asas superficiales de VP2 [24, 25]. Para ello se consideraron cuatro criterios: 1) que al asa a modificar se encontrara en el lado externo de la partícula; 2) el valor de los factores B cristalográficos, que mide el desplazamiento de un átomo en un cristal, que implican vibraciones asociadas a la temperatura o desorden estático, que en cualquier caso indican qué regiones son menos críticas para la estabilidad de la partícula viral; 3)



participación en contactos en las interfaces entre subunidades de VP2 y la energía de dichos contactos; 4) cambios en la longitud de las mismas asas en otros virus con plegamiento similar. De las asas analizadas, se seleccionaron tres como las más propicias para recibir inserciones sin alterar significativamente la competencia de VP2 para autoensamblarse. Las asas seleccionadas fueron la 62-75, 265-271 y 301-313 (Fig. 3). La primera muestra los coeficientes B más altos, mientras que la última no presentó densidad electrónica [26], lo que sugiere una mayor vibración o desorden estático.



**Figura 3. Análisis de las asas superficiales de la proteína VP2 en las VLPs de B19V (PDB 1S58).** (A) Estructura de VP2 coloreada de acuerdo con sus coeficientes cristalográficos B (azul, valores bajos; rojo, valores altos). Del lado superior derecho se encuentran las asas superficiales externas. (B) Gráfico de los coeficientes B para los átomos de cada residuo de la proteína VP2. Se destacan las asas de interés.

Para probar la posibilidad de insertar péptidos en estas asas, nuevamente utilizamos los péptidos FII y FIV provenientes del RSV. Tras la construcción de los genes quiméricos, su expresión en *E. coli* en forma de cuerpos de inclusión, su purificación en condiciones desnaturizantes, y finalmente su replegamiento, pudimos constatar que las tres asas pudieron acomodar estos péptidos de 50 residuos sin perder su competencia de ensamble. Más aún, la presencia de estos péptidos mejoró la estabilidad

coloidal de las VLPs formadas. Sin embargo, estos resultados no nos hablan de cómo es el plegamiento de los péptidos heterólogos. En este caso no se puede evaluar el plegamiento del péptido dentro del asa, ya que no tenemos una señal simple que nos permita medirlo, como su actividad o función. Así pues, fue necesario encontrar moléculas que pudieran presentar propiedades, asociadas a su correcto plegamiento, que fueran sencillas de evaluar.

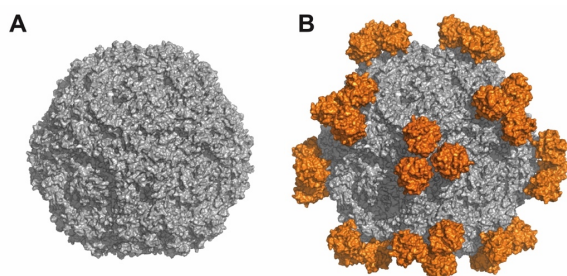
### Presentación de proteínas funcionales

La presentación de péptidos en la superficie de VLPs de B19V, como hemos visto, puede no presentar mayores complicaciones. Sin embargo, cuando se busca que el péptido presente una conformación en particular, el reto resulta más complejo. En este caso, no solo queremos que la proteína estructural del virus retenga su plegamiento, sino que además requerimos que el plegamiento de la proteína heteróloga no se vea impedido por la presencia de VP2.

Con respecto al amino terminal de VP2, fusionamos cuatro dominios de proteínas, una proteína fluorescente y tres enzimas [27]. En todos los casos se esperaba que su actividad o fluorescencia funcionara como reportero del plegamiento de las proteínas heterólogas. Como enzimas, se utilizaron  $\alpha$ -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae*, lipasa A de *B. pumilus*, y dihidrofolato reductasa de *Homo sapiens*. Por otro lado, se utilizó una proteína verde fluorescente llamada “superfolder” (sfGFP), que se distingue por tener mutaciones que aceleran su plegamiento y la hacen muy estable [28]. Todas las construcciones se expresaron en *E. coli* como cuerpos de inclusión y nuevamente fueron purificados por IMAC en condiciones desnaturizantes. Finalmente, se eliminó el agente desnaturizante para dar paso a su autoensamble, y aquí comenzaron las diferencias importantes con respecto a los péptidos. Las cuatro quimeras presentaron una capacidad muy limitada para formar VLPs, generando partículas pequeñas que podrían ser capsómeros u oligómeros de estos capsómeros. No obstante, todas formaron una pequeña fracción de proteína ensamblada en el tamaño de las VLPs. Este resultado sugiere que la capacidad de autoensamble no está del todo perdida, sino que existe un importante impedimento estérico al tener grandes dominios conviviendo en la vecindad del eje de simetría de orden 5. De acuerdo con esta hipótesis, sería posible formar VLPs con estas quimeras siempre que se reduzca este impedimento estérico. Para tal fin decidimos incluir la proteína VP2 con la proteína quimérica en relación molar 3:1,

encontrando que bajo estas condiciones las VLPs se forman eficientemente e incluyen a la proteína quimérica en su estructura. Bajo estas condiciones se probó la función de los dominios heterólogos, encontrando que ni el de  $\alpha$ -glucosidasa ni el de dihidrofolato reductasa presentaban actividad con sus respectivos sustratos. En contraste, la lipasa y sfGFP presentaron sus funciones de lipasa/esterasa y fluorescencia, respectivamente. Esto hace patente la importancia de la capacidad intrínseca de la proteína heteróloga de plegarse de manera autónoma. Mientras que, por ejemplo, la lipasa de *B. pumilus* se repliega *in vitro* [29], la  $\alpha$ -glucosidasa de *S. cerevisiae* no lo hace [30]. Esos resultados sugieren que la falta de actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa y la presencia de actividad de la lipasa se deben a la propia naturaleza de éstas, y no al hecho de estar fusionadas con VP2. Nuevamente, la necesidad de incluir VP2 para el ensamble de estas quimeras en VLPs implica que la polivalencia de estas últimas no está totalmente aprovechada.

Al igual que en el caso de los péptidos, se puede recurrir a las asas superficiales para fusionar proteínas [29]. Dadas las características del asa 301-313, decidimos que era un punto de inserción con muchas posibilidades de éxito. En esta asa, entre los residuos 307 y 308 de VP2 insertamos dominios de la misma lipasa de *B. pumilus*, y la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP) con la idea de presentarlos en la superficie sin que se estorben mutuamente (Fig. 4).



**Figura 4. Decoración de VLPs de B19V con dominios funcionales.** A) Partícula no decorada (PDB 1S58). B) Modelo de la partícula decorada con la lipasa de *B. pumilus* en el asa 301-313.

Tras la expresión, purificación y el replegamiento de las quimeras, el dominio de lipasa no afectó de manera negativa al ensamble de las VLPs y, del mismo modo, presentó actividad de lipasa/esterasa. Por el contrario, el dominio de EGFP no presentó fluorescencia ni durante la expresión en *E. coli*, ni posteriormente al replegar las quimeras para ensamblar VLPs, a pesar de haber sido capaces de ensamblar VLPs. Es posible que el plegamiento de la

EGFP haya estado comprometido al estar fusionado por ambos extremos con la VP2. Tomando esto en cuenta, decidimos usar el mismo dominio de sfGFP que previamente fusionamos en el extremo N-terminal de VP2. Además, incluimos secuencias espaciadoras de 11 residuos de Gly y Ser flanqueando a la sfGFP para darle mayor libertad conformacional durante el plegamiento y ensamble. Esta nueva construcción presentó fluorescencia desde que se expresó, generando cuerpos de inclusión amarillos a simple vista. Tras la purificación de la quimera, esta fue capaz de ensamblar VLPs y retener su fluorescencia.

Cabe destacar que tanto la actividad de lipasa/esterasa como la intensidad de fluorescencia de las quimeras se vieron modificadas con respecto a sus formas libres. Es posible que las construcciones puedan ser optimizadas para mejorar sus propiedades, siempre que se tenga un plan de uso para las VLPs, es decir, saber a qué pH, temperatura y fuerza iónica se empleará.

#### Construcción de VLPs híbridas

El potencial tecnológico de las VLPs de B19V puede ser ampliado si multiplicamos sus funciones. Ya vimos que es posible ensamblar VLPs a partir de VP2 y una de sus quimeras. De hecho, el virión está formado de VP2 y VP1, por lo que pareciera que las VLPs híbridas son la regla y no la excepción para este virus. Si esto es cierto, tampoco hay impedimento para que el número de quimeras aumente, es decir, tener más de una quimera además de VP2. Con las quimeras ya formadas, decidimos probar si se podían ensamblar VLPs a partir de las quimeras que tienen los dominios de sfGFP y de lipasa en sus extremos N-terminales. La construcción que tiene la lipasa, además tiene un dominio de proteína de unión a maltosa en el extremo N-terminal de la enzima. Este fue insertado con el fin de ayudar en su purificación por afinidad, y aquí nos serviría para separar todas aquellas VLPs que tengan el dominio de lipasa. Si esta fracción de proteínas además tiene fluorescencia, esto constituiría una prueba de que realmente se trata de VLPs híbridas que tienen el dominio de lipasa y el de sfGFP. Los resultados experimentales del ensamble de VLPs a partir de VP2, lipasa-VP2 y sfGFP-VP2 arrojó una población de VLPs que, al ser purificada por cromatografía en una columna de amilosa, mantenía la actividad de lipasa/esterasa además de la fluorescencia característica de la sfGFP. El análisis de esta fracción de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

(SDS-PAGE) reveló la presencia de las tres proteínas en dicha fracción [27].

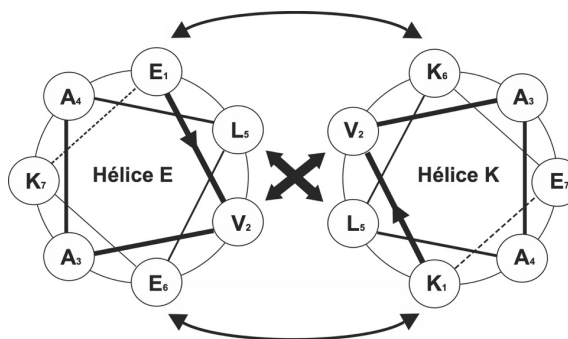
### Construcción de oligo-VLPs

El éxito en la construcción de VLPs híbridos sugiere que es posible tener partículas multifuncionales con aplicaciones potenciales. Considerando que además de los péptidos o proteínas funcionales que pueden acarrear en la superficie, las VLPs pueden encapsular fármacos, enzimas o bien ácidos nucleicos con actividad biológica. Esto abre la posibilidad de tener una partícula que pueda tener tropismo por tejidos específicos y que además lleve a esos tejidos una molécula que aporte una actividad terapéutica. Si esto ya suena interesante, imaginemos una partícula con esas propiedades que además acarrea a otra u otras partículas con propiedades iguales o distintas, de modo que se puedan establecer sinergias entre las propiedades de esas partículas. Esto permitiría reducir la concentración sistémica de partículas, ya que su tropismo hará que la concentración en el tejido específico sea mucho mayor a la del resto del organismo.

Con esto en mente, nos dimos a la tarea de buscar elementos proteicos con propiedades específicas, la primera es que se plieguen en una estructura ordenada (a estos elementos se le conoce como foldámeros), y la segunda es que en disolución sean capaces de interactuar en forma predecible con otros elementos similares (a estos elementos se les conoce como tectones) [31]. Existen varios elementos proteicos que cumplen con estas características. El primero en el que nos enfocamos fue en el sistema heterodimerizante “espiral E/K” (*E/K coil*). Este sistema está compuesto por dos hélices complementarias formadas por heptadas de residuos de aminoácido con las secuencias EVAALEK, para el péptido E, y KVAALKE, para el péptido K [32]. Estas hélices se enrollan una sobre la otra formando una espiral en la que los residuos hidrofóbicos Leu y Val forman un núcleo hidrofóbico, mientras que los residuos de Glu hacen interacción salina con los residuos de Lys (Fig 5).

Estos tectones bien podrían presentarse en la superficie de las VLPs de B19V mediante fusión genética en su extremo N-terminal. Así pues, se construyeron genes que codificaban para los péptidos E5 y K5 (el numeral se refiere al número de repeticiones de la heptada) seguidos de la proteína VP2. Estas proteínas se expresaron y purificaron para obtener VLPs, las cuales se analizaron por DLS y se purificaron por cromatografía de exclusión molecular (SEC) [33]. Las partículas formadas por la quimera

E5-VP2 tuvieron un tamaño de ~27.1 nm, mientras que las partículas formadas con K5-VP2 presentaron un tamaño de ~21.5 nm. Al mezclar cualquiera de estas con VLPs formadas con VP2, no se observó ningún cambio significativo en el tamaño por DLS. Sin embargo, al mezclar las VLPs formadas con cada una de las quimeras, se observó un cambio importante de tamaño (Tabla 1).



**Figura 5.** Representación helicoidal de un heterodímero espiral E/K con una sola heptada. Las flechas indican interacciones hidrofóbicas entre Val y Leu (V y L), así como iónicas entre los pares Glu/Lys (E/K) que rodean el núcleo hidrofóbico.

El efecto de los tectones complementarios E5 y K5 provocó un aumento importante en el tamaño de las VLPs ( $41.5 \pm 6.3$  nm). Un análisis de las especies formadas por ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA), reveló que las VLPs individuales tienen distintas movilidades, siendo E5-VP2 la más móvil y K5-VP2 la menos móvil. Mientras que el producto de la interacción entre ambas VLPs presentó una movilidad mayor a la de K5-VP2, pero mucho menor a la de E5-VP2 (no mostrado). Finalmente, el análisis por AFM del producto de la interacción mostró especies que bien pueden corresponder a dímeros y trímeros de VLPs (Fig. 6).

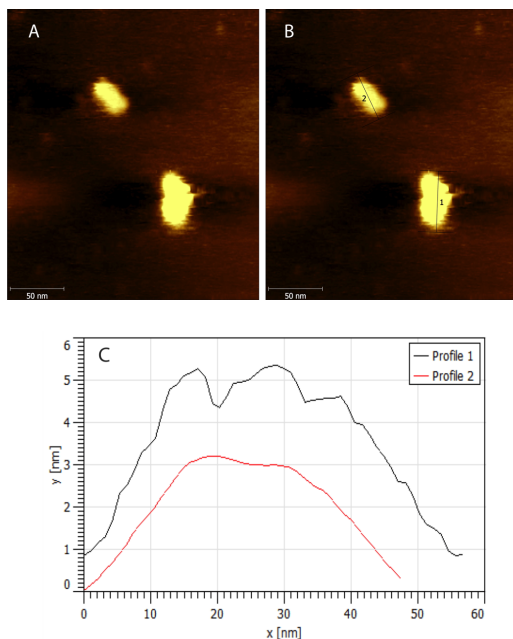
**Tabla 1.** Diámetro de las VLPs individuales y sus formas oligomerizadas mediante los tectones E5 y K5.

Proteína	Tamaño (nm $\pm$ DS)		
	VP2	E5-VP2	K5-VP2
K5-VP2	$21.4 \pm 5.6$	$41.5 \pm 6.3$	$21.5 \pm 4.1$
E5-VP2	$25.2 \pm 4.8$	$27.1 \pm 4.9$	
VP2	$23.7 \pm 5.7$		

Los resultados demuestran que la interacción a través de la espiral E5/K5 funcionó adecuadamente. Sin embargo, es importante llevar estas oligo-VLPs a sistemas *in vivo* para determinar si se mantendrían juntas durante la jornada que los lleva desde el punto de inyección hasta el interior de las células. Recordemos que estos péptidos velcro tienen



constantes de disociación en el orden de 60 pM [34], lo cual hace a esta interacción muy estable pero no indestructible.



**Figura 6.** Análisis por AFM de las estructuras formadas por interacción de las VLPs que presentan los tectones complementarios E5 y K5. (A) Imagen de altura. (B) Mediciones del perfil de altura sobre las partículas. (C) Perfiles de altura. El perfil 1 sugiere que la partícula está compuesta de tres VLPs, mientras que la correspondiente al perfil 2 está formada por solo dos VLPs. Las barras de escala son de 50 nm.

## Conclusiones

Las VLPs son excelentes andamios para la construcción de biomateriales. Aquí presentamos muchas de las modificaciones que se pueden hacer sobre las VLPs derivadas de la proteína VP2 del B19V. Su extremo N-terminal puede ser usado para la fusión de péptidos y proteínas completas que modifican las propiedades de estas partículas. Del mismo modo, existen asas superficiales que se han podido modificar sin impedir el autoensamble de estas quimeras. La capacidad de coensamblar VP2 con una o varias quimeras de VP2 es también una virtud de estas proteínas que puede ser explotada con fines médicos o tecnológicos. Finalmente, la construcción de oligómeros de estas partículas promete ser una herramienta biomédica para la entrega de fármacos y otras moléculas terapéuticas que actúen de manera sinérgica en el tratamiento de padecimientos complejos, como el cáncer o enfermedades neurodegenerativas.

## Agradecimientos

Este trabajo contó con apoyo del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), proyectos IN200316 e IN205119.

## Referencias

- Yildiz, I., Shukla, S., y Steinmetz, N. F. (2011) *Curr. Opin. Biotechnol.* **22**, 901-908.
- Roy, P. y Noad R. (2008) *Hum. Vaccin.* **4**, 5-12.
- Steinmetz, N. F. y Manchester, M. (2011) *Viral nanoparticles: Tools for materials science and biomedicine*. Pan Stanford Publishing Pte. Singapur.
- Toft, L., Tolstrup, M., Müller, M., Sehr, P., Bonde, J., Storgaard, M., Østergaard, L. y Søgaard, O. S. (2014) *Hum. Vaccin. Immunother.* **10**, 1147-1154.
- Yan, D., Wei, Y. Q., Guo, H. C. y Sun, S. Q. (2015) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 10415-10432.
- Takahashi, R. U., Kanesashi, S. N., Inoue, T., Enomoto, T., Kawano, M. A., Tsukamoto, H., Takeshita, F., Imai, T., Ochiya, T., Kataoka, K., Yamaguchi, Y. y Handa, H. (2008) *J. Biotechnol.* **135**, 385-92.
- Brune, K. D., Buldun, C. M., Li, Y., Taylor, I. j., Brod, F., Biswas, S. y Howarth, M. (2017) *Bioconjug. Chem.* **28**, 1544-1551.
- Pickens, C. J., Johnson, S. N., Pressnall, M. M., Leon, M. A. y Berkland, C. J. (2018) *Bioconjug. Chem.* **29**, 686-701.
- Koudelka, J. K. y Manchester, M. (2010) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **14**, 810-817.
- Szuchmacher, B. A., Soto, M. C., Wilson, D. C., Cole, D. J., Kim, M., Gnade, B., Chatterji, A., Ochoa, F. W., Lin, T., Johnson, E.J. y Ratna, R. B. (2004) *Nano Lett.* **4**, 867-870.
- Bronstein, M. L. (2011) *Small* **12**, 1609-1618.
- Steinmetz, F. N. (2010) *Nanomedicine* **6**, 634-641.
- Young, N. S. y Brown, K. E. (2004) *N. Engl. J. Med.* **350**, 586-597.
- Sánchez-Rodríguez, S. P., Münch-Anguiano, L., Echeverría, O. M., Vázquez-Nin, G. H., Mora-Pala, M., Dordick, J. S. y Bustos-Jaimes, I. (2012) *Biochimie* **94**, 870-878.
- Sánchez-Rodríguez, S. P., Morán-García, A. C., Bolonduro, O., Dordick, J. S. y Bustos-Jaimes, I. (2016) *Acta Biomater.* **35**, 206-214.
- Miyamura, K., Kajigaya, S., Momoeda, M., Smith-Gill, S. J. y Young, N. S. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 8507-8511.
- Ogasawara, Y., Amexis, G., Yamaguchi, H., Kajigaya, S., Leppla, S. H. y Young, N. S. (2006) *In Vivo* **20**, 319-324.
- Amexis, G. y Young, N. S. (2006) *J. Infect. Dis.* **194**, 790-794.
- Michel, P. O., Mäkelä, A. R., Korhonen, E., Toivola, J., Hedman, L., Söderlund-Venermo, M., Hedman, K. y Oker-Blom, C. (2008) *J. Virol. Methods* **152**, 1-5.
- Morán-García, A. C., Rivera-Toledo, E., Echeverría, O., Vázquez-Nin, G., Gómez, B. y Bustos-Jaimes, I. (2016) *Virus Res.* **224**, 12-18.
- Neurath, A. R., Kent, S. B., Parker, K., Prince, A. M., Strick, N., Brotman, B. y Sproul, P. (1986) *Vaccine* **4**, 35-37.
- Yamada, T., Iwasaki, Y., Tada, H., Iwabuki, H., Chuah, M. K., VandenDriessche, T., Fukuda, H., Kondo, A., Ueda, M., Seno, M., Tanizawa, K. y Kuroda, S. (2003) *Nat. Biotechnol.* **21**, 885-890.
- De Falco, S., Ruvoletto, M. G., Verdoliva, A., Ruvo, M., Raucci, A., Marino, M., Senatore, S., Cassani, G., Alberti, A.,

- Pontisso, P. y Fassina, G. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 36613-36623.
24. Aguilar D. (2014) Modificación de asas superficiales de la proteína VP2: efectos en la formación de partículas tipo virus. Tesis de Maestría, UNAM.
25. Santillán-Urbe, J. S., Valadez-García, J., Morán-García, A. C., Santillán-Urbe, H. C. y Bustos-Jaimes, I. (2015) *Virus Res.* **201**, 1-7.
26. Kaufmann, B., Simpson, A. A. y Rossmann, M. G. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 11628-11633.
27. Segovia C. L. (2018) Construcción y caracterización de partículas tipo virus multifuncionales de parvovirus B19. Tesis de Maestría, UNAM.
28. Pédelacq, J. D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T. C. y Waldo, G. S. (2006) *Nat. Biotechnol.* **24**, 79-88.
29. Bustos-Jaimes, I., Soto-Román, R. A., Gutiérrez-Landa, I. A., Valadez-García, J. y Segovia-Trinidad, C. L. (2017) *J. Biotechnol.* **263**, 55-63.
30. Soto I. A. (2017) Producción caracterización y replegamiento de una  $\alpha$ -glucosidasa quimérica de *Saccharomyces cerevisiae* expresada en *Escherichia coli*. Tesis de Licenciatura, UNAM.
31. Bromley, E. H., Sessions, R. B., Thomson, A. R. y Woolfson, D. N. (2009) *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 928-930.
32. Litowski, J. R. y Hodges, R. S. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 37272-37279.
33. Santillán H. C. (2017) Construcción y caracterización de estructuras supramoleculares basadas en el parvovirus B19. Tesis de Maestría, UNAM.
34. De Crescenzo, G., Litowski, J. R., Hodges, R. S. y O'Connor-McCourt, M. D. (2003) *Biochemistry* **42**, 1754-1763.



### DR. ISMAEL BUSTOS JAIMES

Obtuvo el grado de Químico de Alimentos por la Facultad de Química de la UNAM en 1995, y los de Maestría en Biotecnología y Doctorado en Ciencias Bioquímicas por la misma universidad en 1998 y 2001. Recibió la Medalla al Mérito Universitario "Alfonso Caso" por la mejor tesis doctoral en 2001. Realizó estudios posdoctorales en el Instituto Mexicano del Petróleo y en la Facultad de Química de la UNAM. Posteriormente realizó una estancia de investigación en el *Institut für Molekulare Enzymtechnologie*, de la Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf, en Alemania, becado por la Fundación Alexander von Humboldt.

Desde 2005 es Profesor de la Facultad de Medicina de la UNAM, en la que actualmente es Profesor Titular "C". Pertenece a la Academia Mexicana de Ciencias, a la Sociedad Mexicana de Bioquímica, y al SNI, nivel 1. Ha dirigido 2 tesis de doctorado, 5 de maestría y 17 de licenciatura. Actualmente dirige 3 tesis doctorales, 9 de maestría y 1 de licenciatura.

Cuenta con 24 años de antigüedad como académico, impartiendo diversos cursos de pregrado en las Facultades de Medicina, Química, y Ciencias de la UNAM, así como en el posgrado en Ciencias Bioquímicas de la misma institución.

Actualmente desarrolla distintas líneas de investigación, como el estudio de interacciones moleculares en enzimas alostéricas, biocatálisis, y construcción de biomateriales.

Ha publicado 38 artículos en revistas de investigación y difusión, así como un capítulo de libro.