



## MECANISMO DE ENCAPSIDACIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE PARTÍCULAS PSEUDO-VIRALES DE VP1 DE POLYOMAVIRUS

Francisco Ipinza Fernández-Dávila, Shamayim Ramírez Puebla, Brianda López Santini, Rafael Vázquez-Duhalt, Sergio A. Águila,

Centro de Nanociencias y Nanotecnología, UNAM, Ensenada, B.C., Km 107 Carretera Tijuana-Ensenada, C.P. 22800, [fipinza@cryn.unam.mx](mailto:fipinza@cryn.unam.mx)

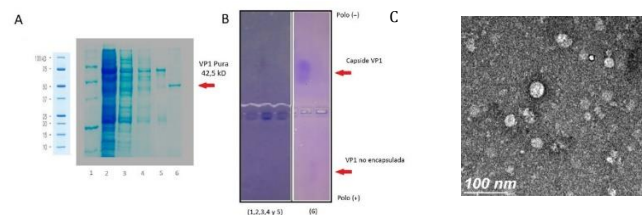
*Palabras clave:* VP1, VLP, cápside pseudo-viral

**Introducción.** Dentro de las aplicaciones de la Bionanotecnología se encuentra la Nanomedicina, enfocada a la utilización de materiales a nanoescala en Medicina. Actualmente, la búsqueda de nuevas terapias contra enfermedades se enfoca en el desarrollo de vehículos a nanoescala por su capacidad de transporte y entrega de fármacos de manera dirigida, lo que ha abierto un campo en la investigación de nanomateriales. Entre éstos se encuentran las partículas pseudo-virales (VLP) capaces de componer una cápside viral sin contenido genético que se caracterizan por ser inocuas, estables, modificables y capaces de encapsular moléculas. La estrategia de este proyecto radica en entender el ensamblaje de una cápside en base a la proteína VP1 de poliomavirus expresada heterológamente para la encapsidación de proteínas, generando conjugados con uso potencial en tratamientos médicos. Para el estudio de ensamblado de los complejos conjugados se utilizaron citocromo P450 mutante BM3 (CYPBM3) y las proteínas verde fluorescente (GFP) y roja fluorescente (RFP) ya que presentan tamaños equivalentes y estructura similar, pero cargas netas opuestas, con el objeto de estudiar la estabilidad de la cápside en el tiempo, condiciones de pH y fuerza iónica. Además, se estudió la estructura molecular y se mejoró la conjugación de las proteínas con el vehículo mediante simulaciones moleculares, por medio del estudio de la superficie electrostática. El objetivo de este trabajo fue diseñar, producir y caracterizar nanopartículas pseudovirales biocatalíticamente activas.

**Metodología.** Las proteínas CYPBM3 mutante "21B3", GFP y RFP se clonaron en el vector pBAD-TOPO y se expresaron heterológamente en *E. coli* BL21 Rosetta TM 2(DE3)pLysS. Cada purificación se realizó utilizando FPLC (cromatografía líquida rápida de proteínas). La proteína VP1 de *Poliomavirus murino* se expresó y se indujo en el vector pGEX-4T-2 utilizando la metodología de Chuan y col., 2008. Se sintetizaron conjugados covalentes VP1 con CYPBM3 mutante "21B3" y las proteínas GFP y RFP. La encapsidación de CYPBM3, GFP y RFP dentro de la cápside de VP1 fue mediante el protocolo de ensamble de Chuan y col. 2010. Los ensayos fueron verificados bioquímicamente mediante geles nativos de proteínas y en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). El estudio de la estructura molecular del pentámero de VP1 y las proteínas a encapsular se

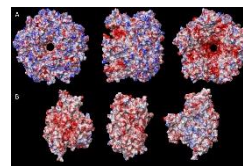
realizó utilizando el programa Desmond Maestro (versión 3.4.0.2). Se estudió el potencial electrostático de superficie y los cambios a pH 6, 7, 8 y 9.

**Resultados.** Se obtuvo la proteína VP1 de Poliomavirus murino de forma pura y se estudió el ensamblado de las cápsides. Se analizaron mediante una caracterización bioquímica utilizando geles SDS-PAGE (Fig. 1a y b) y TEM (Fig. 1c).



**Fig. 1** Purificación de VP1 poliomavirus. A) Purificación de VP1 en SDS-PAGE, 1: estándar de peso molecular; 2: extracto crudo; 3: resina Glutación Sefarosa; 4: lavados y elusión; 5: VP1-GST; 6: VP1 pura; b) Geles nativos en agarosa 1% que muestran la cápside formada. c) Cápsides ensambladas de VP1 vacías observadas en TEM.

Se estudió la estructura molecular de la proteína VP1 y de las proteínas encapsidadas CYPBM3, GFP y RFP mediante la determinación de la superficie electrostática, que es importante para la formación de la cápside y su estabilidad (Fig. 3).



**Fig. 3:** Potencial electrostático de superficie. A) Pentámero de VP1 B) Monómero CypBM3 2123. El color rojo representa las cargas negativas y el color azul las cargas positivas.

**Conclusiones.** Se caracterizaron y sintetizaron conjugados VP1-CYPBM3, GFP y RFP. Se encontraron diferentes condiciones de estabilidad de acuerdo al pH y fuerza iónica ensayados.

**Agradecimiento.** Este trabajo fue subsidiado por la beca DGAPA (UNAM) del Dr. Francisco Ipinza y por el proyecto PAPIIT IB200613.

**Bibliografía.** Chan YP, Lua LH, Middelberg AP. 2008. *J Biotechnol.* 134: 64-71.  
Chuan YP, Fan YY, Lua LH, Middelberg AP. 2010. *JR Soc Interface.* 7: 409-421.