

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Doctorado en Ciencias  
en Ciencias de la Vida  
con orientación en Microbiología**

---

**Diseño de nanorreactores con actividad citocromo P450  
activados con glucosa oxidasa**

Tesis  
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias

Presenta:

**Oscar González Davis**

Ensenada, Baja California, México  
2020

Tesis defendida por  
**Oscar González Davis**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dr. Rafael Vázquez Duhalt**  
Director de tesis

**Dr. Rubén Darío Cadena Nava**

**Dr. Alejandro Huerta Saquero**

**Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera**



---

**Dra. Patricia Juárez Camacho**  
*Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la vida*

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**  
Directora de Estudios de Posgrado

*Oscar González Davis © 2019*

*Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.*

Resumen de la tesis que presenta **Oscar González Davis** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Microbiología.

### **Diseño de nanorreactores con actividad citocromo P450 activados con glucosa oxidasa**

Resumen aprobado por:

---

Dr. Rafael Vázquez Duhalt  
Director de tesis

En el presente trabajo se diseñaron y evaluaron cuatro estrategias para producir nanorreactores con actividad citocromo P450 activados por la enzima glucosa oxidasa (GOx) proveniente de *Aspergillus niger*. En primer instancia se trabajó con co-encapsidar ambas enzimas dentro de partículas tipo virus (VLPs) del virus del moteado clorótico del frijol caupí (CCMV). La segunda estrategia consistió en funcionalizar la superficie de partículas inorgánicas de ZnO y TiO<sub>2</sub>. Así mismo, se trabajó en la producción de una proteína de fusión a partir de la amplificación por PCR del gen que codifica para la GOx así como el dominio hemo del citocromo P450 de *Bacillus megaterium*, CYP<sub>BM3</sub>21B3. Finalmente, la estrategia con mejores resultados consistió en encapsidar al CYP<sub>BM3</sub>21B3 dentro de VLPs a partir de las cápsides del bacteriófago P22. Los nanorreactores producidos fueron funcionalizados sobre la superficie externa con la enzima glucosa oxidasa para que en presencia de glucosa se generara peróxido de hidrógeno necesario para llevar a cabo la activación del citocromo. Se realizó una caracterización cinética de los nanorreactores utilizando 2,6-dimetoxifenol en combinación con glucosa como sustratos, así mismo, las VLPs fueron caracterizadas mediante microscopía electrónica de transmisión en donde fue posible observar la conjugación de la GOx sobre la superficie de los nanorreactores. Por último, como prueba de concepto se evaluó la capacidad de transformación de los disruptores endocrinos bisfenol A, nonilfenol, 17β-estradiol, triclosano y resorcinol por efecto del CYP<sub>BM3</sub>21B3 mediante cromatografía líquida de alta presión y los productos de transformación fueron identificados mediante espectrometría de masas. La capacidad de transformación de compuestos estructuralmente diversos, fácil producción y disponibilidad de sustrato en el organismo hacen de estos reactores una plataforma interesante para la entrega enzimática dirigida en aplicaciones terapéuticas. Adicionalmente, los resultados obtenidos han dado pauta a continuar con líneas de investigación enfocadas a la activación de profármacos utilizados en la terapia contra el cáncer de mama.

**Palabras clave:** nanorreactor, citocromo P450, reacción enzimática, partículas tipo virus, glucosa oxidasa.

Abstract of the thesis presented by **Oscar González Davis** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Life Sciences with an orientation in Microbiology.

### **Design of nanoreactors with cytochrome P450 activity activated by glucose oxidase**

Abstract approved by:

---

Dr. Rafael Vázquez Duhalt  
Thesis Director

This work comprises the design and evaluation of four strategies for the production of nanoreactors with cytochrome P450 activity activated by the enzyme glucose oxidase (GOx) from *Aspergillus niger*. The first strategy tested consisted of co-encapsulation of cytochrome P450 and GOx inside virus-like particles (VLPs) from the cowpea chlorotic mottle virus (CCMV). The second strategy consisted in the functionalization of zinc oxide as well as titanium dioxide nanoparticles with (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) and attached both enzymes on their surface. Another strategy evaluated was the production of a fusion protein based on the cloning of the genes codifying for GOx as well as the heme domain of the cytochrome P450 from *Bacillus megaterium*, CYP<sub>BM3</sub>21B3. Finally, the best results were obtained when CYP<sub>BM3</sub>21B3 was encapsulated inside VLPs from the bacteriophage P22 and functionalized with GOx on the external surface of the nanoreactors in order to generate the hydrogen peroxide necessary to activate the cytochrome. Enzyme kinetics based on the Michaelis-Menten equation were established using 2,6-dimethoxyphenol and glucose as substrates. Additionally, the VLPs were characterized by electronic transmission microscopy which allowed us to identify individual GOx molecules conjugated on the surface of the reactors. Lastly, as a proof of concept, the capacity of CYP<sub>BM3</sub>21B3 to transform the endocrine disruptors bisphenol A, nonylphenol, 17 $\beta$ -estradiol, triclosan and resorcinol was evaluated by high pressure liquid chromatography (HPLC) and the transformation products were identified by mass spectrometry. The capacity to transform structurally diverse compounds, ease of production and substrate availability make these reactors an interesting platform for directed delivery of enzymes in therapeutic applications. The results obtained in this work have allowed us to explore different research lines mainly focused on the localized activation of prodrugs used in breast cancer therapies.

**Keywords:** nanoreactor, cytochrome P450, enzymatic reaction, virus-like particles, glucose oxidase.

## Dedicatoria

*A mis hijos André y Damián;  
jamás imaginé la plenitud que darían a mi vida.*

## Agradecimientos

Mi estancia en el CICESE y en el departamento de Bionanotecnología del CNYN/UNAM ha sido una experiencia muy gratificante. Termine este capítulo muy agradecido por todo lo aprendido y por tener el gusto de haber conocido y tratado con las personas que hicieron posible que este trabajo se realizara. Estoy en deuda con todos ustedes y trabajaré por contribuir en el desarrollo de nuevos investigadores como ustedes lo hicieron conmigo. Es preciso agradecer:

La confianza y oportunidad brindada por el Dr. Rafael Vázquez Duhalt en aceptarme en su grupo y estar al pendiente de mi trabajo en todo momento. El liderazgo, apoyo y paciencia del Dr. Vázquez han sido críticos en mi crecimiento profesional y son metas a seguir en mi carrera académica. Gracias doc!

Todas las observaciones, comentarios y críticas por parte de la Dra. Laura A. Palomares, el Dr. Alejandro Huerta y el Dr. Rubén D. Cadena. Su disposición y apoyo han sido invaluable.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca para realizar mis estudios de Doctorado y financiar al proyecto SEP-CONACYT 251241. Así mismo, agradezco al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) y al Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM por abrirme sus puertas y brindarme todo el apoyo necesario para realizar este trabajo.

A la Dra. Kanchan Chauhan y el Dr. Andrés Zárate por todo el tiempo, esfuerzo y dedicación que le han brindado a este proyecto desde el primer día en que llegaron al CNYN. En adición a su contribución científica, valoro su amistad y tolerancia.

A la M.A. Itandehui Betanzo; el apoyo desinteresado y actitud de servicio que le brindas a toda persona con quien tratas debe servir como ejemplo a todos. Quien tiene ganas de trabajar impulsa a los demás y el laboratorio de Bionanotecnología ha sido otro desde que te integraste. Gracias por toda tu ayuda, amistad y plática. ¡Que siga muchos años más!

A las Dras. Ana Rodríguez, Patricia Juárez, M. del Pilar Sánchez y Karla Oyuki por todas las atenciones recibidas a lo largo del proyecto y por constantemente buscar maneras en apoyarme tanto científica como personalmente. ¡Gracias!

A las Dras. María Teresa Viana, Elizabeth Ponce y Edna Sánchez por su apoyo con reactivos, cepas y equipo de laboratorio.

A los Dres. Haydeé López, Dante Magdaleno, Julio Valencia, Sergio Quiñones y Javier Pérez. Excelentes investigadores y aún mejores amigos.

A los técnicos Francisco Ruíz por la caracterización TEM, Aldo Rodríguez por toda su ayuda con las videoconferencias y equipo de cómputo y Jaime Mendoza por la preparación de muestras así como amistad, consejos y viajes imaginarios por el mundo. ¡Gracias chino!

A las asistentes Adriana Mejía, Linda Lomelí y Larisa Campos por toda su ayuda y facilitar el proceso de trámites durante estos años.

A todos mis familiares y amigos, por el simple hecho de estar presentes.

A mis padres y hermana por el apoyo incondicional y ayuda desmedida que nos han brindado a André, Damián, Rosa y a mí. No hay un momento en que no hayan estado dispuestos a tratar de mejorar nuestras vidas y por ello estoy eternamente agradecido.

A mi esposa Rosa, por siempre impulsarme a mejorar y dar todo de ti para acercarme a ello sin importar los sacrificios que eso pudiera implicar en tu persona. Quiero pensar que algún día recordaremos estos momentos y sonreiremos viendo que valió la pena la distancia. Admiro tu humildad y sencillez, te admiro a ti. Te amo.

## Tabla de contenido

Resumen en español .....	ii
Resumen en inglés .....	iii
Dedicatoria .....	iv
Agradecimientos .....	v
Lista de figuras .....	x
Lista de tablas.....	xi
<b>Capítulo 1. Introducción</b>	
1.1 Introducción .....	1
<b>Capítulo 2. Antecedentes</b>	
2.1 Hemoproteínas.....	4
2.2 Citocromos P450 .....	4
2.2.1 Ciclo catalítico .....	5
2.2.2 CYP <sub>BM3</sub> 21B3.....	6
2.3 Glucosa Oxidasa .....	7
2.4 Nanorreactores enzimáticos .....	7
2.5 Partículas tipo virus: VLPs.....	8
2.5.1 CCMV .....	9
2.5.2 Bacteriófago P22 .....	9
2.5.3 Nanorreactores enzimáticos utilizando el CCMV y P22 .....	10
2.6 Disruptores endócrinos .....	13
<b>Capítulo 3. Hipótesis y objetivos</b>	
3.1 Hipótesis.....	14
3.2 Objetivos .....	14
3.2.1 Objetivo general .....	14
3.2.2 Objetivos específicos.....	14
<b>Capítulo 4. Metodología</b>	
4.1 Co-encapsidación de GOx y CYP <sub>BM3</sub> 21B3 en VLPs del CCMV.....	15
4.1.1 Producción, extracción y purificación del virus del CCMV .....	15

4.1.2 Purificación de las proteínas de cápside del virus del CCMV .....	16
4.1.3 Expresión y purificación del CYP <sub>BM3</sub> 21B3 .....	17
4.1.4 Glucosa oxidasa .....	18
4.1.5 Encapsidación de enzimas en VLPs del CCMV.....	19
4.1.6 Medición de la actividad enzimática de las enzimas libres y encapsidadas .....	21
4.1.7 Determinación de constantes catalíticas del CYP <sub>BM3</sub> 21B3 y la GOx.....	22
4.2 Nanopartículas de ZnO y TiO <sub>2</sub> .....	22
4.2.1 Funcionalización enzimática.....	22
4.2.2 Dispersión.....	23
4.2.3 Medición de la actividad enzimática .....	24
4.2.4 Microscopía electrónica de transmisión .....	24
4.3 Proteína de fusión GOx-CYP <sub>BM3</sub> 21B3 .....	24
4.3.1 Extracción de ADN genómico de <i>A. niger</i> .....	24
4.3.2 Clonación del gen de la GOx en el vector pCWORI .....	25
4.3.3 Clonación de los genes GOx y CYP <sub>BM3</sub> 21B3 en el vector pBAD/ <i>myc</i> -His B .....	28
4.4 Nanorreactores a partir del bacteriófago P22 .....	30
4.4.1 Obtención de VLPs P22-CYP <sub>BM3</sub> 21B3 .....	30
4.4.2 Deglicosilación de la enzima GOx.....	31
4.4.3 Funcionalización de las VLPs P22-CYP <sub>BM3</sub> 21B3 con GOx .....	32
4.4.4 Medición de la actividad enzimática .....	33
4.4.5 Determinación de constantes catalíticas .....	33
4.4.6 Transformación de disruptores endocrinos.....	33
4.4.7 Identificación de los productos de transformación .....	34
4.4.8 Microscopía electrónica de transmisión .....	35

## Capítulo 5. Resultados y discusión

5.1 Co-encapsidación de GOx y CYP <sub>BM3</sub> 21B3.....	36
5.1.1 Purificación del virus y proteínas de cápside del CCMV .....	36
5.1.2 Expresión y purificación del CYP <sub>BM3</sub> 21B3 .....	37
5.1.3 Determinación de las constantes catalíticas del CYP <sub>BM3</sub> 21B3 y la GOx.....	37
5.1.4 Encapsidación de enzimas en VLPs del CCMV.....	38
5.1.5 Actividad enzimática de los nanorreactores .....	41
5.2 Nanopartículas de ZnO y TiO <sub>2</sub> .....	41
5.2.1 Funcionalización enzimática.....	41

5.2.2 Medición de la actividad enzimática .....	45
5.3 Proteína de fusión GOx-CYP <sub>BM3</sub> 21B3 .....	46
5.3.1 Clonación del gen de la GOx en el vector pCWORI .....	46
5.3.2 Clonación de los genes GOx y CYP <sub>BM3</sub> 21B3 en el vector pBAD/ <i>myc</i> -His B .....	49
5.4 Nanorreactores a partir del bacteriófago P22 .....	51
5.4.1 Obtención de VLPs P22-CYP <sub>BM3</sub> 21B3 .....	51
5.4.2 Funcionalización de las VLPs P22-CYP <sub>BM3</sub> 21B3 con GOx .....	52
5.4.3 Deglicosilación de la enzima GOx.....	54
5.4.4 Determinación de constantes catalíticas .....	57
5.4.5 Transformación de disruptores endocrinos .....	58
5.4.6 Identificación de los productos de transformación .....	60
<b>Capítulo 6. Conclusiones</b>	
6.1 Conclusiones.....	62
<b>Literatura citada</b>	
Literatura citada .....	64

## Lista de figuras

Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida de la CP CCMV .....	36
Figura 2. CYP <sub>BM3</sub> 21B3 purificado .....	37
Figura 3. Ensayo de movilidad electroforética de la encapsidación de GOx .....	39
Figura 3. Ensayo de movilidad electroforética de la coencapsidación de GOx y CYP <sub>BM3</sub> 21B3 .....	40
Figura 4. Actividad enzimática de los nanorreactores CCMV-GOx-CYP <sub>BM3</sub> 21B3 .....	42
Figura 5. Nanopartículas de ZnO-GOx-CYP <sub>BM3</sub> 21B3 observadas al TEM .....	43
Figura 6. Diámetro hidrodinámico promedio de las nanopartículas-GOx-CYP <sub>BM3</sub> 21B3 .....	44
Figura 7. Actividad enzimática de las NPs de ZnO y TiO <sub>2</sub> funcionalizadas con GOx-CYP <sub>BM3</sub> 21B3 .....	46
Figura 8. Gel de agarosa con el fragmento GOx y el vector purificado pCWORI .....	47
Figura 9. Ligación del fragmento GOx al vector pCWORI conteniendo el gen CYP <sub>BM3</sub> 21B3 .....	48
Figura 10. Gel de agarosa del vector pBADmyc-His B y fragmentos GOx y CYP <sub>BM3</sub> 21B3 .....	50
Figura 11. Gel de agarosa de los fragmentos de amplificación del gen de la GOx y CYP <sub>BM3</sub> 21B3 .....	51
Figura 12. Purificación de VLPs del P22-CYP .....	52
Figura 13. Actividad enzimática de los nanorreactores P22-GOx-CYP <sub>BM3</sub> 21B3 .....	54
Figura 14. Gel de poliacrilamida de la GOx deglicosilada .....	55
Figura 15. Comparación de la actividad enzimática de los nanorreactores P22-GOx-CYP <sub>BM3</sub> 21B3 .....	56
Figura 16. Nanorreactores P22-CYP <sub>BM3</sub> 21B3-GOx .....	57
Figura 17. Cinética Michaelis-Menten de los nanorreactores P22-CYP <sub>BM3</sub> 21B3-GOx .....	58
Figura 18. Transformación de DEs por los nanorreactores P22-CYP <sub>BM3</sub> 21B3-GOx .....	59

## Lista de tablas

Tabla 1. Proporciones CP CCMV y GOx. ....	19
Tabla 2. Proporciones de CP CCMV, GOx y CYP <sub>BM3</sub> 21B3; ensayo 1. ....	20
Tabla 3. Proporciones de CP CCMV, GOx y CYP <sub>BM3</sub> 21B3; ensayo 2. ....	20
Tabla 4. Proporciones de CP CCMV, GOx y CYP <sub>BM3</sub> 21B3; ensayo 3. ....	21
Tabla 5. Proporciones de GOx y CYP <sub>BM3</sub> 21B3 utilizadas con las nanopartículas inorgánicas. ....	22
Tabla 6. Oligonucleótidos externos para el gen de la GOx. ....	25
Tabla 7. Condiciones de la PCR con oligonucleótidos externos GOx. ....	26
Tabla 8. Oligonucleótidos internos para el gen de la GOx. ....	26
Tabla 9. Condiciones de la PCR con oligonucleótidos internos GOx. ....	26
Tabla 10. Oligonucleótidos para verificar la construcción GOx-CYP <sub>BM3</sub> 21B3. ....	28
Tabla 11. Oligonucleótidos para el gen de la GOx incorporando los sitios XhoI y BamHI. ....	28
Tabla 12. Condiciones de la PCR con oligonucleótidos XhoI y BamHI para la GOx. ....	28
Tabla 13. Oligonucleótidos para el gen del CYP <sub>BM3</sub> 21B3 incorporando los sitios BamHI y XbaI. ....	29
Tabla 14. Condiciones de la PCR con oligonucleótidos XhoI y BamHI para el CYP <sub>BM3</sub> 21B3. ....	29
Tabla 15. Enzimas de restricción utilizadas para clonar en pBAD/myc-His B. ....	30
Tabla 16. Enzimas utilizadas para deglicosilar GOx. ....	32
Tabla 17. Condiciones analíticas utilizadas. ....	34
Tabla 18. Constantes catalíticas del CYP <sub>BM3</sub> 21B3. ....	38
Tabla 19. Constantes catalíticas de la GOx. ....	38
Tabla 20. Actividades específicas y principales productos de transformación de los EDCs. ....	61

# Capítulo 1. Introducción

---

## 1.1 Introducción

La nanotecnología es un campo de rápido crecimiento en donde los materiales son sintetizados a escala nanométrica tomando ventaja de las propiedades únicas que estos presentan tales como mayor fuerza, menor peso, mayor conductividad eléctrica y reactividad química comparada con sus equivalentes a mayor escala. Los nanomateriales han revolucionado múltiples campos industriales con la introducción de nuevos procesos y materiales en aeronáutica, generación de energía, nuevos recubrimientos y en usos ambientales, sin embargo su potencial uso ha sido notorio en el desarrollo de la medicina. En este sentido, la nanomedicina es una rama de la medicina en la que se aplican las herramientas nanotecnológicas para la prevención y tratamiento de enfermedades e involucra el uso de nanomateriales tales como nanopartículas biocompatibles y nanodispositivos en los organismos.

Hoy en día existe un gran esfuerzo de investigación enfocado al uso de nanopartículas para la entrega controlada de fármacos. El diseño de nanoacarreadores conteniendo fármacos específicos que puedan ser direccionados a tejidos o incluso a células diana con el fin de incrementar la eficiencia del tratamiento y así reducir las dosis requeridas es la principal meta de estos sistemas “inteligentes”. No obstante, estas nanopartículas también pudieran ser utilizadas como nanobiorreactores llevando enzimas para el tratamiento de enfermedades originadas por la deficiencia de actividad enzimática, algo conocido como terapia de reemplazo enzimático (Duve, 1966).

Los nanobiorreactores son nanopartículas con actividad enzimática; son la combinación de los sofisticados mecanismos catalíticos de las enzimas con las excepcionales propiedades de los nanomateriales los cuales pueden ser funcionalizados con ligandos para receptores celulares específicos. El diseño de estos nanobiorreactores está basado en el acoplamiento, encapsidación o inserción de enzimas en ensamblajes poliméricos donde pueden actuar *in situ* y tienen la ventaja de poder modular e incluso mejorar las terapias de reemplazo enzimático que tradicionalmente han sido empleadas con enzimas libres (Yari et al., 2017; Grabowski y Hopkin, 2003; Solomon y Muro, 2017).

Existen muchos desafíos asociados a la entrega y retención de actividad enzimática y por ello, se ha buscado emplear ambientes biocompatibles e inertes para prevenir interferencias con la estructura nativa de enzimas las cuales pueden ser altamente sensibles al ambiente (Holcenberg, 1982). La premisa de

utilizar nanopartículas basadas en biomateriales para la inmovilización y entrega enzimática es debido a que poseen alta actividad específica gracias a su relación tamaño/área superficial lo cual tiende a facilitar la exposición de sitios activos involucrados en las reacciones catalíticas. Adicionalmente, pueden ser fácilmente modificadas con grupos funcionales para unir covalentemente a las enzimas, reducen las limitaciones de la difusión a la par de incrementar su estabilidad y direccionamiento, protegen de la proteólisis y más importantemente, son compatibles con los componentes celulares (Koyani et al., 2017).

Aún dadas las prometedoras aplicaciones médicas de las bionanopartículas, su uso como acarreadores de actividad enzimática ha obtenido menor atención que aquellos utilizados para la entrega de fármacos. El suministro de enzimas a las células de interés tradicionalmente ha sido realizado mediante el uso de anticuerpos, en donde la enzima es conjugada con un anticuerpo capaz de unirse a antígenos sobre la superficie de las células diana (Springer y Niculescu-Duvaz, 1997). No obstante, el actual conocimiento en la tecnología del ADN y proteínas recombinantes ha abierto un campo de investigación con mucho potencial terapéutico y han comenzado a utilizarse otras estrategias como el uso de vectores virales (Xu y McLeod, 2001; Sánchez-Sánchez et al., 2014).

Las VLP's (por sus siglas en inglés "virus-like particles") son proteínas virales repetitivas, altamente ordenadas con gran capacidad de carga que no contienen el material genético del virus (Lua et al., 2014). El empleo de estas nanopartículas tiene varias ventajas sobre otros mecanismos; su tamaño facilita el empleo vía intravenosa, intramuscular o subcutánea con irritación reducida, son fácilmente modificables para evadir el sistema inmune del hospedero y pueden interaccionar con biomoléculas sobre la superficie celular sin alterar su funcionamiento y propiedades bioquímicas (Sultana et al., 2013).

Por otro lado, la versatilidad catalítica de los citocromos P450 (CYP) así como la diversidad de sustratos transformados ha incrementado el interés por su uso biotecnológico, médico e incluso ambiental. Una de las principales limitantes en el uso de estas monooxigenasas como catalizadores es la necesidad de contar con el poder reductor de cofactores. Estas costosas fuentes de electrones limitan su uso *in vitro* si no se adicionan sistemas regeneradores de cofactores. Una alternativa de menor costo energético involucra el uso de aceptores de electrones alternos como los peróxidos, sin embargo no todos los CYPs son eficientes en el uso de estos aceptores finales de electrones y por lo general presentan actividad muy baja (Gillam, 2008; Kumar y Halpert, 2005).

Uno de los citocromos con capacidad catalítica autosuficiente capaz de utilizar el peróxido es el CYP102 de *B. megaterium* (CYP<sub>BM3</sub>). Esta enzima ha sido modificada mediante evolución dirigida para tener mayores velocidades catalíticas (Cirino y Arnold, 2003a). No obstante, a pesar de los grandes avances logrados en

relación a los gastos energéticos requeridos para activar las distintas variantes del CYP<sub>BM3</sub>, el requerimiento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sigue siendo una de las mayores limitantes para su uso como agente terapéutico debido a la inhabilidad del organismo de generar peróxido en los momentos y sitios apropiados para su activación. Una estrategia propuesta es el empleo de enzimas como la glucosa oxidasa (GOx), una enzima con elevada actividad catalítica encargada de la oxidación de β-D-glucosa a glucono-δ-lactona con la concomitante reducción de oxígeno molecular a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Frederick et al., 1990).

Los reportes sobre el uso de VLP's para la encapsidación de CYPs son limitados, no obstante, recientemente autores como Sánchez-Sánchez et al. (2014) han experimentado el uso de distintas cápsides virales para la entrega eficiente de actividad enzimática. En este trabajo se propone el diseño y construcción de un nanobioreactor basado en la encapsidación de citocromo dentro de cápsides virales funcionalizadas en su superficie con GOx que sea capaz de activar al CYP<sub>BM3</sub> utilizando únicamente glucosa como fuente inicial de electrones. Las potenciales aplicaciones biomédicas son múltiples pero en este trabajo se enfocan a la transformación de disruptores endócrinos y la activación de profármacos utilizados en la terapia contra el cáncer de mama.

## Capítulo 2. Antecedentes

---

### 2.1 Hemoproteínas

El grupo prostético hemo consiste en un anillo tetrapirrólico formando un complejo con un átomo de hierro. Los cuatro grupos pirrol se encuentran unidos entre sí mediante puentes metino y dan lugar a lo que se conoce como porfirina. El átomo de hierro del grupo hemo se encuentra hexacoordinado por cuatro ligandos ecuatoriales correspondientes a los nitrógenos de la porfirina y las dos interacciones adicionales se encuentran por encima y debajo del plano ecuatorial. En el caso de las hemoenzimas que acoplan oxígeno y peróxidos, el quinto ligando pertenece al grupo tiol de un residuo de cisteína de la cadena polipeptídica. El sexto ligando y el más distal al grupo hemo, es un átomo de oxígeno proveniente de O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O o peróxido. Este último ligando corresponde al centro catalítico de estas enzimas (Cirino, 2004).

En general se considera que las hemoproteínas realizan tres funciones principales: el transporte de oxígeno, la transferencia de electrones y la catálisis de reacciones de óxido-reducción utilizando oxígeno o peróxido más electrones adicionales (Bernhardt, 2006). En este trabajo nos enfocaremos a un grupo de hemoproteínas formado por una sola cadena polipeptídica y un grupo hemo constituido por la protoporfirina IX, los llamados citocromos P450 (CYPs).

### 2.2 Citocromos P450

Los citocromos P450 son una superfamilia de hemoproteínas constitutivas e inducibles responsables de metabolizar un gran número de sustratos, principalmente a través de reacciones de oxidación, pero también reducción e hidrólisis (Nebert y Russell, 2002). Su nombre originó a partir de la observación de que el monóxido de carbono puede unirse al hierro ferroso del CYP (la forma reducida de la enzima) para formar un complejo Fe<sup>2+</sup>-CO el cuál produce un cambio en el máximo de absorbancia del grupo hemo (el pico de Soret) pasando de ~418 nm a ~450 nm (Omura y Sato, 1964).

Los CYPs han sido nombrados en orden de su descubrimiento así como en el porcentaje de similitud que existe en la secuencia de sus amino ácidos. De acuerdo a Nelson (2013), hasta agosto de 2013 se conocían más de 18,500 secuencias de CYPs de las cuales 57 son humanas (Kumar, 2010). Los genes pertenecientes a esta superfamilia están categorizadas en familias (secuencias idénticas mayores al 40%) en donde la

nomenclatura es numérica, subfamilias (secuencias idénticas >55%) con nomenclatura alfabética y genes individuales nombrados numéricamente (Nelson et al., 1996).

Estas enzimas pueden encontrarse en numerosas especies y de acuerdo a Nelson et al. (1993), son sumamente antiguas con un gen ancestral que precede la divergencia entre células procariotas y eucariotas. Con base a su función, por lo general son separadas en dos grandes grupos: aquellas encargadas del metabolismo de xenobioticos -compuestos exógenos- al que pertenecen las familias CYP1-3 y en algunas ocasiones CYP4, o bien a la síntesis y metabolismo de sustratos endógenos tales como esteroides, ácidos grasos y prostaglandinas en el cual participan el resto de los CYPs (Capdevila et al., 1992).

La estructura de los CYPs son relativamente conservadas; todas las estructuras conocidas mantienen algún elemento en común a pesar de presentar una similitud cercana a un 20% en las secuencias de los miembros de la superfamilia. A pesar de ello, existe suficiente diversidad en el plegamiento de estas enzimas para permitir la unión de sustratos significativamente distintos en tamaño y con diferentes grados de especificad; en algunos casos existe un alto grado de regio y stereo-especificidad en la oxigenación del sustrato, mientras que en otros un solo citocromo es capaz de metabolizar más del 50% de los fármacos comercializados (Denisov et al., 2005). En su mayoría están compuestas por  $\alpha$ -hélices etiquetadas de A-L iniciando del grupo N-terminal y de forma general son más conservadas en la región que rodea al grupo hemo, mientras que las regiones más variables constituyen los sitios de anclaje a la membrana o bien, los de unión y reconocimiento del sustrato (Guengerich, 2001).

En adición a los métodos anteriormente mencionados, los CYPs pueden ser clasificados en 4 grupos de acuerdo a la manera en que los electrones acceden al sitio activo de la enzima. En la clase I, las proteínas utilizan un dominio reductasa conteniendo FAD y una ferridoxina. En la clase II, estas enzimas utilizan una cadena transportadora de electrones más corta y solo requieren la reductasa que contiene FAD/FMN. Los citocromos de la clase III son autosuficientes y no requieren donadores de electrones. Finalmente, aquellos miembros de la clase IV reciben los electrones directamente a partir de NAD(P)H (Werck-Reichhart y Feyereisen, 2000).

### **2.2.1 Ciclo catalítico**

Los CYPs son un grupo enzimático muy versátil; son capaces de catalizar una gran variedad de procesos así como llevar a cabo el metabolismo de un elevado número de sustratos. Salvo algunas excepciones, los

citocromos requieren de oxígeno molecular y NAD(P)H para oxidar sus sustratos. Típicamente actúan como monooxigenasas uniendo oxígeno molecular al grupo hemo y finalmente insertando un átomo de oxígeno a la molécula del sustrato mientras que el otro átomo es reducido a agua (Munro et al., 2018). Entre las distintas oxidaciones catalizadas por los CYPs se incluyen reacciones de hidroxilación y epoxidación, N- y S-oxidaciones, desalquilaciones y desaminaciones, entre otros (Bernhardt, 2006).

El ciclo catalítico inicia con la unión de sustrato al sitio activo. Esta unión produce el desplazamiento de una molécula de agua e incrementa el potencial positivo del hierro en el grupo hemo lo que a su vez facilita la introducción del primer electrón proveniente del NAD(P)H mediante una cadena transportadora de electrones. En este estado, el ion ferroso une un átomo de oxígeno y acepta el segundo electrón para dar lugar a un anión férrico el cuál en los siguientes pasos es protonado hasta romper el enlace O-O y generar una molécula de agua. La molécula intermediaria, llamada “compuesto I” actúa sobre el sustrato y genera el producto hidroxilado que inmediatamente después es disociado para permitir la unión de una molécula de agua al ion férrico y así reiniciar el ciclo (Denisov et al., 2005).

En muchos CYPs existe una vía alterna en la que el sustrato puede ser hidroxilado de forma directa mediante peróxidos sin la necesidad de contar con sistemas donadores de electrones que permitan la activación del oxígeno molecular. Estas vías con actividad peroxigenasa tienden a ser mucho menos eficientes y pueden llevar a la modificación e inactivación del grupo hemo, sin embargo, abren la posibilidad de llevar a cabo reacciones catalíticas dependientes de CYP en ambientes libres de células y sin la necesidad de la regeneración de NAD(P)H, proteínas adicionales, o bien, oxígeno molecular (Munro et al., 2018).

### **2.2.2 CYP<sub>BM3</sub>21B3**

El citocromo P450<sub>BM3</sub> (CYP102) proveniente de *Bacillus megaterium* es una enzima encargada de la hidroxilación de ácidos grasos de entre 12 y 18 carbonos. Adicionalmente tiene la capacidad de hidroxilar amidas y alcoholes de cadena larga así como la epoxidación de ácidos grasos insaturados. Es considerado un CYP autosuficiente debido a que contiene los dominios hemo y reductasa en una misma cadena polipeptídica (Ruettinger et al., 1989). Aprovechando esta capacidad catalítica, Cirino y Arnold (2003) construyeron una variante del dominio hemo (21B3) capaz de utilizar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con alrededor de 20 veces mayor eficiencia que la enzima parental. Posteriormente Salazar et al. (2003) continuaron con evolución dirigida para producir una variante significativamente más termoestable. No obstante, estas variantes aún eran susceptibles a la inactivación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por lo que Vidal-Limón et al. (2013) generaron por medio de

un diseño racional y con el uso de técnicas híbridas QM/MM, una variante estable a la presencia de peróxido. El hecho de tener los dominios reductasa y oxigenasa sobre el mismo péptido, así como las generalmente mayores tasas de recambio y facilidad de expresión en *Escherichia coli*, han hecho de los CYPs bacterianos una alternativa más atractiva como biocatalizadores (Kumar, 2010).

## 2.3 Glucosa Oxidasa

La glucosa oxidasa (GOx) es una enzima con dimensiones de 60 x 52 x 77 Å (Hecht et al., 1993) y un peso molecular de 157 kDa altamente glicosilada conteniendo alrededor de 190 residuos de manosa y 16 residuos de N-acetilglucosamina los cuales representan cerca del 24% del peso molecular de la proteína (Kalisz et al., 1991). Estructuralmente está constituida por dos cadenas polipeptídicas idénticas covalentemente unidas mediante puentes disulfuro las cuales contienen, cada una, dos moléculas de flavina adenina dinucleótido (FAD) (Kalisz et al., 1990; Rando et al., 1997).

Esta enzima ha sido purificada a partir de distintas fuentes fúngicas, principalmente del genero *Aspergillus* y *Penicillium* de los cuales *A. niger* ha sido la especie mayormente utilizada para su producción a grande escala. Es una proteína con elevada actividad catalítica encargada de la oxidación de  $\beta$ -D-glucosa por oxígeno molecular para generar peróxido de hidrógeno y glucono- $\delta$ -lactona el cual se hidroliza espontáneamente para formar ácido glucónico. La oxidación de la  $\beta$ -D-glucosa a glucono- $\delta$ -lactona involucra la reducción del cofactor FAD a FADH<sub>2</sub> el cuál a su vez es oxidado por el oxígeno molecular para generar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Frederick et al., 1990; Leskovac et al., 2005).

## 2.4 Nanorreactores enzimáticos

Los nanorreactores son nanopartículas con actividad enzimática; son la combinación de los sofisticados mecanismos catalíticos de las enzimas con las excepcionales propiedades de los nanomateriales. Adicionalmente, pueden ser fácilmente funcionalizados con ligandos para receptores celulares específicos.

El diseño de los nanorreactores se basa en la conjugación, encapsidación o inserción de enzimas en ensamblajes supramoleculares poliméricos en donde puedan actuar *in situ* (Vriezema et al., 2005). No obstante, existen varios desafíos asociados a la entrega y retención de la actividad enzimática y debido a esto, los ambientes inertes y biocompatibles en donde se limite la interferencia con las estructuras nativas

de las enzimas (que son altamente sensibles al ambiente) es una característica altamente buscada (Holcenberg, 1982; Mitchell et al., 2002). Estos ambientes pueden ser modulados por parámetros externos como la temperatura, pH o fuerza iónica y por consiguiente, permiten controlar tanto la estabilidad de las nanopartículas como la actividad catalítica (Koyani et al., 2017).

La premisa detrás del uso de nanopartículas para la inmovilización y entrega enzimática es el hecho de que intrínsecamente poseen alta reactividad debido a su tamaño pequeño y amplia área superficial. En adición, al emplear biomateriales para su producción, se facilita el acceso a los sitios activos desencadenando las reacciones catalíticas, pueden ser fácilmente modificadas con grupos funcionales para adherir covalentemente a las enzimas, se incrementa su estabilidad y capacidad de direccionamiento, protegen a las enzimas de proteólisis y de forma más importante, son compatibles con los componentes celulares (Koyani et al., 2017). Finalmente, la modificación superficial de estas estructuras con moléculas como el polietilenglicol (PEG) puede reducir la respuesta inmune y así disminuir aún más la degradación enzimática así como incrementar su tiempo de circulación en el torrente sanguíneo (Lin et al., 2018; Xie et al., 2009; M. Zhao et al., 2011).

## **2.5 Partículas tipo virus: VLPs**

De forma nativa, los genomas virales se encuentran confinados en una cápside formada por proteínas multiméricas organizadas simétricamente con una habilidad intrínseca de auto-ensamblaje espontáneo la cual brinda protección y estabilidad al cargo para su posterior entrega a la célula huésped. Inicialmente considerados como patógenos a combatir, los virus son quizá las entidades proteicas auto-ensambladas simétricamente con mayor precisión que se conocen hasta este momento y han emergido como modelo de eficiencia estructural a nanoescala dando lugar al desarrollo de sistemas biomiméticos. Tomando en consideración estas características, las partículas virales han sido manipuladas para generar cápsides carentes de material genético y por ende sin la capacidad de auto-propagación, llamadas partículas tipo virus o VLPs (Carette et al., 2007; Garcea y Gissmann, 2004; Kushnir et al., 2012).

La ingeniería de cápsides virales ha permitido diseñar múltiples VLPs recombinantes explotando el proceso de auto-ensamblado. La mayoría de estas partículas han sido utilizadas para la producción de vacunas, sin embargo, la capacidad de compartimentalizar reacciones químicas a nanoescala ha generado una plataforma altamente versátil para la encapsidación y transporte de diversas moléculas de interés biomédico como las enzimas (Schwarz et al., 2017). Las VLPs poseen múltiples ventajas sobre los productos

generados por síntesis química, incluyendo su tamaño, la disponibilidad de modelos 3D de su estructura y uniformidad de la misma. Por otra parte, el uso de cápsides virales como transportadores proporciona protección contra proteasas, cambios en pH e incrementos en temperatura (Wilkerson et al., 2018). Adicionalmente, pueden ser fácilmente sintetizadas y purificadas mediante cromatografía líquida y ultracentrifugación obteniendo altos rendimientos tanto en hospederos naturales como heterólogos. Finalmente, tomando en cuenta la capacidad de ensamblado y desensamblado *in vitro* así como la flexibilidad de construcción mediante técnicas moleculares o químicas, a permitido el empaquetamiento de moléculas de interés al interior de las cápsides (Zeltins, 2013).

### 2.5.1 CCMV

El virus del moteado clorótico del frijol caupí o CCMV por sus siglas en inglés (cowpea chlorotic mottle virus) es un virus perteneciente a la familia *Bromoviridae* formado por la asociación de 180 proteínas idénticas de 20 kDa conocidas como proteínas de cápside (CP) que dan lugar a un icosaedro de 28 nm de diámetro arreglado en 12 pentámeros y 20 hexámeros. Al interior de la cápside viral, estos bromovirus encapsidan 4 ARNs virales positivos de cadena sencilla que son distribuidos en 3 viriones separados (Ali y Roossinck, 2007; Fox et al., 1998).

El CCMV ha sido un sistema modelo para el estudio del ensamblaje viral por más de 40 años desde que Bancroft y Hiebert (1967) demostraron que moléculas de ARN y proteínas de cápside purificadas pueden reensamblarse *in vitro* para producir viriones infecciosos. El CCMV es estable en un rango de pH entre 4.0 y 7.4 y baja fuerza iónica, sin embargo, al aumentar la fuerza iónica y el pH (>7.5) la cápside es desensamblada. Esta característica de ensamblado y desensamblado ha sido ampliamente utilizada para generar VLPs. Adicionalmente, cuando las cápsides son colocadas en pH cercano 6.5 y se eliminan los iones de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ , la cápside sufre una expansión reversible en la que se generan 60 poros de aproximadamente 2 nm de diámetro que permiten el intercambio de moléculas entre la cavidad interna de la cápside y el medio exterior (Fox et al., 1998; Speir et al., 1995).

### 2.5.2 Bacteriófago P22

El bacteriófago P22 es un virus que infecta a la bacteria *Salmonella typhimurium* y presenta una cápside formada por 420 copias de una CP de 46.6 kDa. Durante la formación de los viriones, la CP requiere

interactuar con entre 100 y 330 copias de una proteína interna adicional de 33.6 kDa conocida como proteína de andamiaje (SP) (Cortines et al., 2011; Patterson et al., 2012a). La interacción de ambas proteínas junto con una proteína de portal y proteínas auxiliares produce una estructura llamada procápside con simetría icosaédrica y un diámetro de 58 nm. El ADN (de doble cadena) es empaquetado al interior de las procápsides lo cual resulta en un incremento de diámetro cercano al 10%. Aunado a esto, las proteínas de andamiaje son expulsadas de forma intacta y finalmente, el virión infeccioso es completado con la adición de las proteínas de cola (Eppler et al., 1991).

Parker et al. (1998) demostraron que la proteína de andamiaje del bacteriófago P22 interactúa con la proteína de capa únicamente en los residuos más distales de la región C-terminal y adicionalmente que puede ser altamente modificada en la región N-terminal ya sea eliminando amino ácidos o bien, fusionando otros genes, sin perder la capacidad de guiar el ensamblado de partículas muy similares a la estructura nativa. Tomando en consideración estos datos, O'Neil et al. (2011) desarrollaron un sistema de expresión heteróloga utilizando una versión trunca de la proteína de andamiaje lo cual facilita la encapsidación programada de productos génicos en altas cantidades al interior de la cápside.

Una característica única de las VLPs del P22 con respecto a otros sistemas es el hecho de que puede sufrir una serie de transiciones estructurales al incrementar la temperatura, las cuales tienen repercusiones dramáticas en el volumen interno y porosidad de las cápsides. El incremento en temperatura a 65°C durante 10 min genera variantes expandidas (EX) con un diámetro externo de 64 nm el cuál incrementa el volumen interno de las cápsides de 58,000 nm<sup>3</sup> a 113,000 nm<sup>3</sup>. Más aún, al incrementar la temperatura a 75°C durante 20 min o más, las cápsides pierden algunas subunidades en los vértices pentagonales lo que genera poros con diámetros de 10 nm lo cuál puede ser utilizado para permitir un mayor acceso al interior de las cápsides (Teschke et al., 2003).

### **2.5.3 Nanorreactores enzimáticos utilizando el CCMV y P22**

El primer reporte en demostrar la permeabilidad de la cápside viral del CCMV hacia un sustrato o producto fue realizado por Comellas-Aragonès et al. (2007). En dicho estudio los autores encapsidaron una peroxidasa de rábano blanco dentro de VLPs derivadas del CCMV y estudiaron su comportamiento enzimático a nivel individual dentro del nanorreactor. El principal resultado de su estudio fue el determinar que la tasa de difusión entre el interior y exterior de las cápsides podía ser manipulado al cambiar el pH del medio gracias al fenómeno de expansión y apertura de poros a pH >6.5 previamente descrito.

A partir de este estudio, uno de los principales intereses fue la producción de reactores multienzimáticos para llevar a cabo reacciones en cascada de manera más productiva. No obstante, la eficiencia de encapsidación en el CCMV era muy baja debido a que en la mayor parte de los casos a pH ácido (necesario para llevar a cabo el ensamblado *in vitro* de las cápsides), las enzimas regularmente presentan cargas superficiales positivas iguales a las encontradas al interior de las cápsides. Así, con el fin de hacer eficientes las estrategias de encapsidación, Minten et al. (2009) emplearon un método de anclado no covalente en el que utilizaron motivos “coiled-coil” para adherir hasta 15 proteínas verdes fluorescentes (GFP) a las CP del CCMV previo al proceso de ensamblado. Tiempo después demostraron que este sistema permitía la coencapsidación de enzimas al confinar fosfolipasa B de *Pseudozyma antártica* y GFP, obteniendo mejores tasas catalíticas que con respecto a enzima libre (Minten et al., 2011).

O’Neil et al. (2011) construyeron un vector plasmídico para expresión heteróloga en *E. coli* conteniendo el gen para la proteína de capa del bacteriófago P22 junto con una versión trunca de la proteína de andamiaje que codifica los amino ácidos 141-303 (SP<sub>141</sub>). A este sistema integraron un sitio de clonación múltiple río arriba del gen de la SP en donde agregaron los genes de distintas proteínas fluorescentes y lograron formar procápsides conteniendo hasta 300 proteínas al interior indistinguibles de las procápsides nativas del P22. Basándose en este sistema, el primer reporte de una enzima activa encapsidada dentro del P22 fue descrito por Patterson et al. (2012a) quienes lograron encapsidar 250 moléculas de alcohol deshidrogenasa, una proteína monomérica de 32 kDa proveniente de *Pyrococcus furiosus*. Posteriormente encapsidaron la  $\beta$ -glucosidasa homotetramérica CelB de *P. furiosus* formada por monómeros de 58 kDa (Patterson, et al., 2012b). La enzima encapsidada no mostró disminución en actividad ni cambios en la afinidad por el sustrato lo cual sugiere que su estructura cuaternaria no se vio perturbada. No obstante, la mayor aportación del estudio fue demostrar la viabilidad del P22 en la encapsidación de enzimas multiméricas.

Patterson et al. (2014a) encapsidaron la enzima homodimérica NADH oxidasa (NOX) dentro de VLPs derivadas del bacteriófago P22 para la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a partir de la reducción de oxígeno. Como resultado encontraron que al difundir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al exterior de las VLPs, las nanopartículas eran capaces de inhibir la proliferación de *E. coli*. En adición, inmovilizaron las VLPs sobre partículas de sílice y encontraron que retenían la actividad catalítica hasta 11 días post-inmovilización. Así mismo, fueron los primeros en construir un sistema multienzimático dentro del P22 con la capacidad de realizar una reacción en cascada a partir de la encapsidación de una proteína de 160 kDa producida por la fusión de  $\beta$ -glucosidasa, galactocinasa y glucocinasa (Patterson, et al., 2014b).

Sánchez-Sánchez et al. (2014) lograron encapsidar hasta 10 moléculas de CYP por VLP del CCMV. En sus ensayos utilizaron CYP<sub>BM3</sub>21B3 para estudiar la capacidad de transformación del profármaco tamoxifeno por los bionanorretores y encontraron que los productos generados eran similares a los obtenidos con citocromos humanos. En un estudio subsecuente, Sánchez-Sánchez et al. (2015) encapsidaron 109 moléculas de CYP dentro de VLPs a partir del bacteriófago P22 logrando disminuir la degradación del CYP por proteasas e incrementar su estabilidad en pH ácido. Estos bionanorretores fueron internalizados en células humanas de carcinoma cervicouterino en donde se observó 10 veces mayor actividad que en las células no transfectadas. Adicionalmente, la adición de moléculas de PEG o PEGilación de las cápsides redujo o eliminó la respuesta inmunogénica y permitió agregar ligandos específicos al extremo libre de las moléculas de PEG de tal manera que los reactores pudieran ser direccionados a las células tumorales (Chauhan et al., 2018; Tapia-Moreno et al., 2017). La internalización mediada por receptores incrementó la actividad del CYP al interior de las células y por tanto, incrementó la sensibilidad de las células hacia el tamoxifeno resultando en una reducción del 50% en la dosis necesaria para matar a estas células (Tapia-Moreno et al., 2017).

Schoonen et al. (2017) utilizaron un polipéptido “tipo elastina” para estabilizar cápsides del CCMV que contenían hasta 4 moléculas de lisozima T4. La actividad de la lisozima T4 es altamente dependiente de la concentración de sal y el pH en el cuál se encuentren, sin embargo, este ambiente resulta inhibitorio para la formación de las VLPs. Al agregar iones divalentes como nickel y cobalto al sistema, las cápsides podían ensamblarse a pH 7.5 y mantener la actividad catalítica de la enzima.

Brasch et al. (2017) coencapsidaron GOx con moléculas de ADN de cadena sencilla al interior de las VLPs del CCMV. El diseño de las moléculas de ADN fue tal, que al entrar en contacto unas con otras y en presencia de hemina, producen una molécula que imita la capacidad catalítica de las peroxidases. El resultado de su trabajo fue la generación de un sistema de reacción en cascada capaz de autoconsumir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido por la GOx en presencia de glucosa. Por otra parte, produjeron un segundo sistema en el cuál acoplaron una gluconocinasa coencapsidada con GOx al interior de las VLPs que al hacer uso de una tercer enzima, la 6-fosfogluconato deshidrogenasa presente en el exterior de las cápsides, era capaz de producir ribulosa-5-fosfato y NADPH en presencia de NADP<sup>+</sup> y ATP.

Finalmente, Chauhan et al. (2018) utilizaron VLPs a partir del P22 para la entrega dirigida de CYPs en conjunto con el efecto sinérgico de terapias fotodinámicas. El reactor conteniendo CYP en su interior fue funcionalizado con un fotosensibilizador basado en porfirina y moléculas de estradiol para dirigir las partículas a células tumorales de cáncer de mama. Este sistema fue capaz de generar especies reactivas de oxígeno al ser iluminado, las cuales en sinergia con la actividad del CYP y su capacidad de transformar

tamoxifeno en la sustancia activa 4-hidroxitamoxifeno, redujeron significativamente la dosis de profármaco necesaria para eliminar las células tumorales.

## 2.6 Disruptores endócrinos

Los disruptores endocrinos (DEs) son compuestos exógenos con el potencial de perturbar la regulación hormonal y el sistema endocrino normal al interferir con la producción, liberación, metabolismo o eliminación de las hormonas naturales. Por otra parte, estos compuestos pueden interactuar con los receptores hormonales en el organismo, consecuentemente afectando la salud y reproducción en animales y el humano (Casals-Casas y Desvergne, 2011; Tabb y Blumberg, 2006).

Los disruptores endocrinos han generado mucha atención en años recientes dado su alto impacto negativo en el ambiente así como riesgos en la salud pública. Día a día surge nueva evidencia de que estos compuestos han contribuido al incremento del síndrome metabólico y se tiene la sospecha de que están asociados con la incidencia de cáncer de mama, patrones de desarrollo anormales, retrasos en el desarrollo neuronal en infantes y cambios en la función inmune (Beszterda y Frański, 2018; Vilela et al., 2018; Matthiessen et al., 2018; Heindel et al., 2017; Monneret, 2017;).

Las hormonas ejercen sus efectos principalmente al interaccionar con sus receptores cognados los cuales pueden ser clasificados en dos grupos: receptores de membrana que responden principalmente a hormonas peptídicas y receptores nucleares que interactúan con hormonas lipofílicas como las hormonas sexuales. Debido que muchos DEs son compuestos lipofílicos, la interacción con los receptores nucleares es una de las principales rutas de acción que resulta en la modulación de la expresión génica. Así, muchos de los DEs asociados a los defectos en la reproducción y desarrollo se cree que resultan de una interferencia entre el disruptor y la función del receptor de estrógenos o andrógenos (Casals-Casas y Desvergne, 2011). Algunos DEs de origen antropogénico con actividad similar a los estrógenos son el bisfenol A (BPA), nonilfenol (NPh) y el antibacterial triclosano (TCS) (Cajthaml et al., 2009).

La biotransformación metabólica para contrarrestar los efectos de los DEs es producida por los CYP y a pesar del alto interés que ha surgido en el estudio de estos compuestos en los últimos años, al momento no existen terapias de desintoxicación en el humano. Considerando el alto impacto en la salud pública así como la ausencia de tratamientos para la desintoxicación de estos compuestos, el uso de nanorreactores con actividad CYP podría ser una buena opción para la biotransformación de disruptores endocrinos en el organismo.

## Capítulo 3. Hipótesis y objetivos

---

### 3.1 Hipótesis

Los nanobiorreactores con actividad citocromo P450 y glucosa oxidasa producidos tendrán la capacidad de ser catalíticamente autosuficientes en presencia de concentraciones intracelulares normales de glucosa.

### 3.2 Objetivos

#### 3.2.1 Objetivo general

Diseñar, producir y caracterizar nanobiorreactores con actividad citocromo P450 y glucosa oxidasa para su uso en aplicaciones biomédicas.

#### 3.2.2 Objetivos específicos

- Coencapsidar las enzimas libres “glucosa oxidasa” proveniente de *A. niger* y el “citocromo P450” de *B. megaterium* (CYP<sub>BM3</sub>21B3) dentro de partículas tipo virus provenientes del virus del moteado clorótico del frijol caupí.
- Funcionalizar la superficie de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> y ZnO con las enzimas glucosa oxidasa y CYP<sub>BM3</sub>21B3.
- Diseñar y producir una proteína de fusión con los dominios catalíticos de la enzima glucosa oxidasa y el CYP<sub>BM3</sub>21B3 para su encapsidación dentro de partículas tipo virus del CCMV.
- Producir un nanobioreactor basado en partículas tipo virus del bacteriófago P22 conteniendo CYP<sub>BM3</sub>21B3 y funcionalizadas con la enzima glucosa oxidasa.
- Evaluar la capacidad catalítica de los nanobioreactores producidos en la transformación de diversos disruptores endócrinos.

## Capítulo 4. Metodología

---

### 4.1 Co-encapsidación de GOx y CYP<sub>BM3</sub>21B3 en VLPs del CCMV

#### 4.1.1 Producción, extracción y purificación del virus del CCMV

La producción de virus del CCMV se realizó mediante infección de plantas de la especie *Vigna unguiculata*. Las plantas fueron sembradas en sustrato Miracle-Gro dentro de un invernadero y regadas dos veces por semana. La infección con el virus se realizó dos semanas posteriores a la germinación realizando pequeñas heridas en la superficie de los cotiledones con una almohadilla de lana de acero superfina, posteriormente fueron depositados 10  $\mu\text{L}$  de virus nativo a una concentración de  $0.1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ . Las hojas de las plantas fueron cosechadas al mostrar un patrón de clorosis aproximadamente una semana posterior a la infección y se mantuvieron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

El proceso de extracción y purificación del virus se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Cadena-Nava y Comas-García (comunicación personal) haciendo algunas modificaciones.

Por cada gramo de hojas cosechadas se adicionaron 2 mL de solución amortiguadora de extracción de virus (acetato de sodio 500 mM, acetato de magnesio 80 mM, pH 4.5 ajustado con ácido acético) y se molieron en licuadora. La solución obtenida fue filtrada con gasa y mezclada con un volumen de cloroformo donde posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 40 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . La fase superior fue colectada y centrifugada en una segunda ocasión durante 25 min. El sobrenatante recolectado fue colocado en agitación durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  para remover cualquier traza de cloroformo.

Se preparó un gradiente de sacarosa de 10 a 40% utilizando una solución de sacarosa al 25% en solución amortiguadora de suspensión. Esta solución fue colocada en volúmenes de 25 mL en 4 a 6 tubos de ultracentrífuga cubiertos con Parafilm. Los tubos fueron congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 1 hr y descongelados a temperatura ambiente. El proceso de congelado y descongelado se repitió al menos 3 ocasiones siempre utilizando gradientes frescos con no más de 1 día de anticipación.

Las muestras mantenidas en agitación fueron colocadas en volúmenes de 25 mL en tubos de ultracentrífuga a los cuales se les agregó 5 mL de sacarosa al 10% en el fondo del tubo. Las muestras fueron

ultracentrifugadas a 32,000 rpm durante 2 hrs y 4°C en un rotor SW-32 Ti utilizando una centrifuga Beckman XPN-100 (Beckman Coulter, Inc.). Cada botón formado fue resuspendido en 500 µL de solución amortiguadora de suspensión (acetato de sodio 50 mM, acetato de magnesio 8 mM, pH 4.5 ajustado con ácido acético) y posteriormente se juntó cada muestra en un solo tubo para centrifugar a 5,000 rpm durante 10 min y 4°C (Sorvall Legend RT, Thermo).

El sobrenatante obtenido fue colocado suavemente por la pared de los tubos conteniendo los gradientes de sacarosa previamente formados y se ultracentrifugaron a 30,000 rpm durante 2 hrs a 4°C. Los tubos fueron colocados en un soporte universal dentro de un cuarto oscuro e iluminados con una lámpara desde la parte inferior. Se observó una banda azul aproximadamente a la mitad de cada tubo la cuál fue recuperada utilizando una pipeta Pasteur y colocada en un tubo de ultracentrífuga en donde se realizó una dilución 1:4 en solución amortiguadora de suspensión para eliminar las trazas de sacarosa. La muestra fue centrifugada a 32,000 rpm durante 3 hrs y 4°C. El sobrenatante fue descartado inmediatamente y el botón obtenido fue resuspendido en un volumen máximo de 500 µL de solución amortiguadora de suspensión dependiendo el tamaño recuperado.

La concentración y pureza del virus nativo fue determinada utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) haciendo mediciones a 260 y 280 nm. El valor de absorbancia a 260 nm fue dividido entre 5.8 (correspondiente al  $\epsilon_{\text{virus}}$ ) para obtener la concentración de la muestra en mg mL<sup>-1</sup>. Solamente fueron utilizadas las muestras que presentaran una razón  $\text{Abs}_{280} / \text{Abs}_{260}^{-1} \geq 1.5$  indicando la pureza óptima del virus. Las muestras de virus fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

#### **4.1.2 Purificación de las proteínas de cápside del virus del CCMV**

El virus nativo fue desensamblado mediante diálisis contra solución amortiguadora de desensamble (CaCl<sub>2</sub> 500 mM, Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, pH 7.5) utilizando membranas de diálisis de 14,000 kDa (Spectrum Laboratories) durante 24 hrs y 4°C. Las muestras dializadas fueron ultracentrifugadas a 50,000 rpm durante 8:30 hrs y 4°C en un rotor 90 Ti (Beckman Coulter, Inc.). El sobrenatante obtenido fue fraccionado en volúmenes de 400 µL comenzando desde la parte superior teniendo cuidado de no resuspender el botón. Cada fracción fue analizada y cuantificada mediante espectrofotometría UV-Vis haciendo mediciones a 260 y 280 nm. Solamente fueron utilizadas las muestras que presentaron una absorbancia  $\geq 0.1$  a 280 nm y una razón  $\text{Abs}_{280} / \text{Abs}_{260}^{-1} \geq 1.5$  indicando la pureza óptima de las proteínas de cápside. Las muestras fueron mezcladas y dializadas en membranas de 14,000 kDa contra solución amortiguadora de

proteínas (NaCl 1 M, Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, pH 7.2) durante 12 hrs y 4°C. La solución de proteínas de cápside fue almacenada un máximo de 2 semanas a 4°C posteriores a la purificación.

#### 4.1.3 Expresión y purificación del CYP<sub>BM3</sub>21B3

El gen para el CYP<sub>BM3</sub>21B3 se encuentra clonado en el vector de expresión inducible por isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) pCWori el cuál además contiene una etiqueta de 6 histidinas para facilitar la purificación de las proteínas de interés. El CYP<sub>BM3</sub>21B3 fue sobre-expresado en *E. coli* de acuerdo a Alejo-González et al. (2017).

La cepa de *E. coli* transformada con el plásmido pCWori fue utilizada para generar un pre-inoculo de 5 mL en medio de cultivo LB (por sus siglas en inglés “Luria-Bertani”; 10 g triptona, 10 g NaCl y 5 g extracto de levadura por litro a pH 7.5) conteniendo 200 µg mL<sup>-1</sup> de ampicilina y mantenido a 37°C y 150 rpm durante 12 hrs.

A partir del pre-inoculo se obtuvo una alícuota de 0.5 mL que fue utilizada para inocular 50 mL de medio TB por sus siglas en inglés “Terrific Broth” (12 g triptona, 24 g extracto de levadura, 4 mL glicerol y 100 mL de solución amortiguadora de fosfatos de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.17 M y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.72 M, pH 7.4) por litro) suplementado con 0.5 mM de tiamina y elementos traza de acuerdo a Joo et al. (1999) (0.011 g MgCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, 0.3 g FeCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, 0.0065 g ZnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O, 0.002 g CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, 0.01 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O, 0.0038 g CaCl<sub>2</sub>, 0.0126 g CuCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O y 0.002 g H<sub>2</sub>BO<sub>3</sub> en 10 mL de una solución de HCl al 10%).

El cultivo en medio TB fue incubado a 25°C y 150 rpm durante 44 hrs. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se adicionó 0.5 mM IPTG y 1 mM ácido aminolevulínico y el cultivo fue mantenido bajo las mismas condiciones 44 hrs adicionales. Las bacterias fueron recuperadas por medio de centrifugación a 3,500 rpm durante 45 min a 4°C en una centrífuga Beckman JXN-26 utilizando un rotor JA-14 (Beckman Coulter, Inc.). El sobrenatante fue descartado y el paquete bacteriano fue reservado a -80°C hasta continuar con el proceso de purificación de la enzima.

Se adicionó un volumen de 10 mL de amortiguador de lisis (imidazol 10 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM y NaCl 300 mM, pH 8.0) por cada gramo de precipitado bacteriano. La suspensión fue sonicada (Vibra cell VCX 600; Sonics & Materials Inc., CT, USA) con embolo CV26 en baño de hielo utilizando un programa de 6 ciclos de sonicado que consistieron en 9.9 s de pulso por cada 9.9 s de descanso durante 2 min utilizando un embolo modelo a 26% de potencia. El producto de lisis fue centrifugado a 12,000 rpm durante 15 min y 4°C del

cuál fue recuperado el sobrenatante y filtrado a través de una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ . El extracto fue concentrado mediante ultrafiltración con AMICON a través de una membrana de 10 kDa hasta reducir el volumen a 0.2 volúmenes iniciales.

El CYP<sub>BM3</sub>21B3 fue separado del extracto utilizando una columna HisTrap<sup>TM</sup> FF de 5 mL precargada con níquel (GE Healthcare) mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC por sus siglas en inglés “Fast Protein Liquid Chromatography”) utilizando un equipo ÄTKA prime plus Protein Purification System (GE Healthcare) con un programa de purificación de proteínas preestablecido que de manera general consiste en realizar un gradiente de concentración de 20 a 500 mM imidazol en una solución amortiguadora de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM y NaCl 300 mM, pH 8.0 a un flujo de 5 mL min<sup>-1</sup>. Las fracciones con color fueron recuperadas y dializadas contra una solución amortiguadora de MES 50 mM, pH 8.0 con 10% glicerol. Finalmente, la solución resultante fue concentrada mediante ultrafiltración a través de una membrana de 30 kDa y almacenada a -20°C hasta ser utilizada.

Para determinar la concentración de CYP<sub>BM3</sub>21B3 catalíticamente activo se utilizó la metodología propuesta por Omura y Sato, (1964) con algunas modificaciones. Este método permite detectar el grupo hemo de la enzima mediante cambios en absorbancia a 450 nm debido a la unión de CO en el sitio activo del CYP. La producción de monóxido de carbono se realizó adicionando ácido fórmico en ácido sulfúrico en una relación 2:1. El ácido sulfúrico deshidrata al ácido fórmico generando CO como producto de la reacción y éste se burbujea dentro de la muestra con CYP con la posterior adición de hidrosulfito de sodio. Se monitoreó la aparición de un máximo de absorbancia en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 836 ET haciendo múltiples barridos de lectura entre 400 y 500 nm hasta dejar de observar cambios en la absorbancia a 450 nm. Finalmente se utilizó un coeficiente de extinción a 450 nm ( $\epsilon_{450}$ ) equivalente a 0.091 nM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> y las lecturas a 450 y 490 nm para determinar la concentración de enzima activa de acuerdo a la ecuación 1:

$$[\text{CYP } \mu\text{M}] = \frac{\text{Abs}_{450} - \text{Abs}_{490}}{0.091} * \text{dilución} \quad (1)$$

#### 4.1.4 Glucosa oxidasa

Se utilizó la enzima comercial glucosa oxidasa proveniente de *A. niger* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Se preparó una solución madre disolviendo 50 mg de GOx en 1 mL de acetato de sodio 50 mM pH 5.1 la cual fue almacenada a -20°C hasta ser utilizada.

#### 4.1.5 Encapsidación de enzimas en VLPs del CCMV

Previo a la coencapsidación de la GOx y el CYP<sub>BM3</sub>21B3 se realizaron una serie de pruebas de encapsidación de la GOx para verificar que esta enzima pudiera ser encapsidada sin la necesidad de modificar su superficie. Los ensayos se realizaron de acuerdo a las proporciones mostradas en la tabla 1. En el caso del CYP<sub>BM3</sub>21B3 no se realizaron ensayos por separado debido a que cuenta con los antecedentes de Sánchez-Sánchez et al. (2014).

**Tabla 1. Proporciones CP CCMV y GOx.**

Proporción CP CCMV a GOx	Proteína (µg)		Volumen total
	CP CCMV	GOx	
12:1	9	0.75	100 µL
8:1		1.125	
6:1		1.50	
3:1		3.00	
1:1		9.00	
1:2		18.00	

Los ensambles se realizaron en tubos de 1.5 mL invertidos a los cuales se les eliminó la parte cónica y se les perforó el tapón para que al colocar una membrana de diálisis (14,000 kDa) entre el tubo y el tapón, se pudiera tener contacto con una solución amortiguadora de ensamble (NaCl 50 mM, Tris-HCl 50 mM, KCl 10 mM y MgCl 5 mM, pH 7.2). Los ensambles se mantuvieron en diálisis durante 12 hrs y 4°C y se transfirieron a una solución amortiguadora de suspensión de virus (acetato de sodio 50 mM, acetato de magnesio 8 mM, pH 6.0 ajustado con ácido acético) en donde se mantuvieron durante 6 hrs. Al plazo, los ensambles fueron devueltos a la solución amortiguadora de ensamble por 12 hrs adicionales.

De acuerdo a una comunicación personal por la Dra. Lorena Hernández, la proporción óptima para realizar una reacción en cascada entre las enzimas GOx y CYP<sub>BM3</sub>21B3 es 12 M de CYP<sub>BM3</sub>21B3 a 1 M de GOx. Con base a estos datos, se realizó una serie de ensayos de coencapsidación utilizando las proporciones de proteína mostradas en las tablas 2 y 3.

**Tabla 2. Proporciones de CP CCMV, GOx y CYP<sub>BM3</sub>21B3; ensayo 1.**

Proporción CP CCMV a GOx	Proteína (µg)			Volumen total
	CP CCMV	GOx	CYP	
12:0.25	24	0.5	7.02	100 µL
12:0.50	24	1.0	7.02	
12:0.75	24	1.5	7.02	
12:1.00	24	2.0	7.02	

**Tabla 3. Proporciones de CP CCMV, GOx y CYP<sub>BM3</sub>21B3; ensayo 2.**

Proporción CP CCMV a CYP <sub>BM3</sub> 21B3	Proteína (µg)			Volumen total
	CP CCMV	GOx	CYP	
12:1	24	0.5	2.0	100 µL
	24	1.0	2.0	
	24	1.5	2.0	
	24	2.0	2.0	

Para separar nanorreactores de la enzima libre, se procedió a ultracentrifugar las preparaciones. De acuerdo a Swoboda y Massey (1965) el coeficiente de sedimentación de la GOx es 8.0S. Así mismo, el coeficiente de sedimentación del CYP<sub>BM3</sub> es de 9.244S (Black y Martin, 1994). Utilizando la fórmula 2:

$$T = \frac{k}{S} \quad (2)$$

donde T es el tiempo en horas para precipitar una muestra, k es el factor k del rotor (en este caso 100.7 para el rotor 90-Ti (Beckman Coulter, Inc.)) y S el coeficiente de sedimentación, se hicieron cálculos para determinar los tiempos de sedimentación cada enzima. Tomando en cuenta los valores obtenidos, las preparaciones se centrifugaron a 45,000 rpm durante 3 hrs y 4°C utilizando dos controles: GOx y CYP libre a la máxima concentración utilizada para los ensambles. En todos los casos, los ensambles se colocaron con sumo cuidado sobre la superficie de 2 mL de solución amortiguadora de ensamble.

Las coencapsidaciones fueron analizadas mediante ensayos de cambio en movilidad electroforética (EMSA por sus siglas en inglés “Electrophoretic Mobility Shift Assay”). El ensayo se realizó en gel de agarosa al 1% utilizando solución amortiguadora de virus (acetato de sodio 100 mM, EDTA 1 mM, pH 6.0) durante 3 hrs a 50 V y 4°C. Al finalizar la corrida, el gel fue teñido con el colorante comercial InstantBlue (Expedeon)

durante toda la noche con agitación suave. En la mañana siguiente los geles fueron lavados con H<sub>2</sub>O Milli-Q y visualizados en un fotodocumentador Smart View Pro 1100 (Major Science).

Con base a los resultados obtenidos en los ensayos de movilidad electroforética, se decidió realizar una tercer coencapsidación incrementando el volumen final a 1 mL de acuerdo a las proporciones mostradas en la tabla 4. Las diálisis se realizaron en bolsa de 14,000 kDa bajo las mismas condiciones anteriormente descritas.

**Tabla 4. Proporciones de CP CCMV, GOx y CYP<sub>BM3</sub>21B3; ensayo 3.**

Proporción CYP <sub>BM3</sub> 21B3 a GOx	Proteína (µg)			Volumen total
	CP CCMV	GOx	CYP	
20.74 : 1	240	10	70	1000 µL
13.82 : 1		15		
11.85 : 1		5	20	
5.93 : 1		10		

#### 4.1.6 Medición de la actividad enzimática de las enzimas libres y encapsidadas

La actividad enzimática de las enzimas libres así como de las enzimas encapsidadas dentro de las VLPs del CCMV se midió por medio de espectrofotometría UV-vis en un equipo Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) utilizando los siguientes medios de reacción:

- La actividad GOx se midió mezclando un volumen de 934 µL de medio de reacción (glucosa 95 mM y guaiacol 16 mM ( $\epsilon_{470} = 26,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) en acetato de sodio 50 mM, pH 5.1), 2 U de peroxidasa de rábano picante (HPR) en 33 µL de H<sub>2</sub>O fría y 33 µL de ensamble. Las preparaciones fueron monitoreadas a 470 nm.
- La actividad CYP se midió mezclando un volumen de 916 µL de medio de reacción (Tris-HCl 50 mM y 2,6-dimetoxifenol 500 µM (DMP;  $\epsilon_{468} = 14,800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), pH 8.0), 51 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 mM y 33 µL de ensamble. Las preparaciones fueron monitoreadas a 468 nm.
- La reacción en cascada GOx-CYP se midió mezclando un volumen de 967 µL de medio de reacción (Tris-HCl 50 mM, DMP 500 µM y glucosa 95 mM, pH 8.0) con 33 µL de ensamble. Las preparaciones fueron monitoreadas a 468 nm.

#### 4.1.7 Determinación de constantes catalíticas del CYP<sub>BM3</sub>21B3 y la GOx

Las constantes catalíticas,  $k_{cat}$  y  $K_M$  de las enzimas libres fueron obtenidas de la siguiente manera:

- Para el CYP<sub>BM3</sub>21B3 se utilizó la metodología descrita en el apartado 4.1.9 variando la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un rango de 0 a 60 mM.
- Para la GOx se utilizó la metodología descrita en el apartado 4.1.9 variando la concentración de glucosa en un rango de 0 a 95  $\mu$ M.

## 4.2 Nanopartículas de ZnO y TiO<sub>2</sub>

### 4.2.1 Funcionalización enzimática

Se emplearon dos metodologías distintas para la funcionalización enzimática de las nanopartículas. En el primer caso se utilizaron nanopartículas de ZnO con un tamaño promedio de 35 nm (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se empleó una metodología modificada a partir de Sabzi et al. (2009) que consistió en el siguiente protocolo;

La funcionalización inició con una concentración de  $1.5 \times 10^{-8}$  moles de CYP<sub>BM3</sub>21B3 y se ajustó la concentración de GOx para evaluar las distintas proporciones enzimáticas mostradas en la tabla 5.

**Tabla 5. Proporciones de GOx y CYP<sub>BM3</sub>21B3 utilizadas con las nanopartículas inorgánicas.**

Proporción CYP <sub>BM3</sub> 21B3 a GOx	Proteína (moles)	
	GOx	CYP
12:0.5	$6.25 \times 10^{10}$	$1.5 \times 10^{-8}$
12:1	$1.25 \times 10^{-9}$	
12:2	$2.5 \times 10^{-9}$	
12:4	$5.0 \times 10^{-9}$	

La preparación de las nanopartículas (silanización) se realizó lavando 10 mg de la solución comercial en 500  $\mu$ L de acetona (tres veces) y resuspendiendo en 500  $\mu$ L de tolueno anhídrido. La solución fue sonicada

de forma continua durante 10 min en sonicador de agua FS20 (Fisher Scientific) y al terminar se agregó un volumen de 20  $\mu\text{L}$  de (3-aminopropil) trietoxisilano (APTES) y 15  $\mu\text{L}$  de trimetilamina. La mezcla se aforó a 5 mL con tolueno anhídrido y fue colocada en reflujo durante 5 hrs con agitación después del cual se centrifugó a 14,000 rpm durante 2 min. El sobrenatante resultante fue eliminado y el paquete de nanopartículas fue lavado por triplicado con etanol absoluto y después con solución amortiguadora de fosfato de sodio 100 mM, pH 5.1 en la cual fueron resuspendidas en un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ .

En el segundo protocolo, se empleó una metodología modificada a partir de Hou et al. (2014) para la funcionalización de nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  con un tamaño promedio de 18 nm (US Research Nanomaterials Inc. TX, USA). Estas nanopartículas fueron maceradas en mortero hasta reducir el volumen inicial a una cuarta parte y se continuó el proceso con 250 mg.

Las nanopartículas fueron resuspendidas en 4.95 mL de etanol absoluto y sonicadas durante 15 min en baño de agua e inmediatamente después durante 15 min adicionales utilizando un sonicador Vibra cell VCX 600 (Sonics & Materials Inc., CT, USA) con embolo CV26 al 26% de potencia y ciclos de 9.9 s de encendido y 0.1 s apagado. Una vez finalizado, se mezcló con 50  $\mu\text{L}$  de una solución de APTES al 10% en etanol absoluto y se colocó en un ambiente de nitrógeno con agitación suave a 65°C durante 24 hrs. Las nanopartículas fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente y lavadas por triplicado con  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q. La preparación se secó a 55°C durante 12 hrs para finalmente ser macerada en mortero y almacenarse a temperatura ambiente hasta su funcionalización enzimática.

La funcionalización enzimática inició utilizando 10 mg de nanopartículas e inmediatamente después mezclando con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y Sulfo-N-hidroxisuccinimida (NHS) disueltas en 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q a una proporción molar 5,000 EDC:1,000 NHS:1 enzima, respectivamente. Las preparaciones se mantuvieron en agitación durante 2 hrs a temperatura ambiente y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 2 min. El botón de nanopartículas fue lavado tres veces con Tris-HCl 50 mM, pH 5.1, resuspendido en un volumen final de 400  $\mu\text{L}$  y almacenado a 4°C hasta su uso.

#### **4.2.2 Dispersión**

Las nanopartículas fueron centrifugadas a 14,000 rpm durante 2 min y lavadas tres veces con una solución al 1% de polivinilpirrolidona (PVP) o bien, goma de xantana al 0.03%. Estas soluciones fueron sonicadas durante 30 min continuos en baño de hielo. Finalmente, fueron diluidas a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en agua Milli-Q y se les midió el diámetro hidrodinámico utilizando el equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd.).

### 4.2.3 Medición de la actividad enzimática

La actividad enzimática se midió utilizando la metodología descrita en el apartado 4.1.9. Debido a la naturaleza de las nanopartículas, se optó por centrifugar las preparaciones previo a la lectura en espectrofotómetro.

Las muestras fueron mezcladas por inversión 3 veces, se dejaron reposar durante 4:30 min y se centrifugaron a 14,000 rpm en una centrifuga Eppendorf 5418 (Eppendorf, NY, USA) durante 30 s. Las lecturas se tomaron utilizando el sobrenatante y una vez finalizado, éste se reincorporó con las nanopartículas. Este proceso se repitió hasta obtener suficientes datos para calcular la velocidad inicial de las reacciones.

### 4.2.4 Microscopía electrónica de transmisión

Se colocó una muestra de 10  $\mu\text{L}$  de nanopartículas con actividad CYP-GOx a una concentración de 0.1 mg  $\text{mL}^{-1}$  sobre una rejilla de cobre cubierta con Formvar (TedPella, USA). Las muestras se mantuvieron durante 2 min y se removió el líquido remanente utilizando papel filtro Whatman. Finalmente, se agregó un volumen de 5  $\mu\text{L}$  de acetato de uranilo al 2% sobre la preparación y se mantuvo durante 2 min adicionales al plazo del cual se removió el exceso de contrastante con papel filtro Whatman. Las muestras se analizaron utilizando un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-2010 operado a 100 kV. Las imágenes obtenidas fueron procesadas utilizando el software ImageJ (NIH).

## 4.3 Proteína de fusión GOx-CYP<sub>BM3</sub>21B3

### 4.3.1 Extracción de ADN genómico de *A. niger*

Se realizó un cultivo en líquido de *A. niger* tomando una asada del hongo crecido en medio sólido e inoculándolo en medio papa dextrosa (PD) a 30°C durante 72 hrs y 150 rpm. El micelio fue lavado por triplicado con H<sub>2</sub>O Milli-Q, congelado con nitrógeno líquido y macerando en mortero hasta obtener polvo fino el cual fue transferido a tubos de 1.5 mL y mezclado vigorosamente con 500  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora de extracción (Tris-HCl 200 mM, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM y SDS al 0.5%, pH 8.5) por

cada 40 mg de micelio. Se agregó un volumen de 500  $\mu\text{L}$  de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló durante 10 min adicionales para después centrifugar a 12,000 rpm durante 5 min a 4°C. La fase acuosa fue mezclada por inversión con 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol, centrifugada y decantada para secar el botón de ADN obtenido.

El botón de ADN fue resuspendido en 200  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O Milli-Q conteniendo 2  $\mu\text{g}$  de RNAsa e incubado durante 60 min a 37°C. Al finalizar la incubación, se realizó una segunda extracción con fenol-cloroformo (25:24) agitando vigorosamente durante 10 min al plazo del cual se centrifugó bajo las condiciones descritas anteriormente. La fase acuosa fue recuperada y mezclada con 500  $\mu\text{L}$  de cloroformo-isoamílico (24:1) donde fue mezclada durante 10 min y centrifugada. Este último procedimiento se realizó por duplicado para finalmente precipitar al ADN con etanol absoluto toda la noche a -20°C. La muestra fue centrifugada a 12,000 rpm durante 30 min a 4°C y el botón generado fue lavado con etanol al 70%, secado a temperatura ambiente y resuspendido en 30  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O Milli-Q.

#### 4.3.2 Clonación del gen de la GOx en el vector pCWORI

En primer instancia se trabajó en insertar el gen que codifica para la GOx dentro del vector pCWORI que contiene el gen para el CYP<sub>BM3</sub>21B3. Para aislar el gen de la GOx proveniente de *A. niger* se utilizaron los siguientes oligonucleótidos externos sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT; Coralville, IA, USA) y descritos por Choi et al. (2011) (tabla 6).

**Tabla 6. Oligonucleótidos externos para el gen de la GOx.**

Nombre	Secuencia
GOx_FWR	5' CCT TTC CTC TCT CAT TCC CTC A 3'
GOx_REV	5' AAT GCC CTT GTT TGG TAG TAA T 3'

Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando 500 pg de ADN de *A. niger*, 0.2  $\mu\text{M}$  de cada oligonucleótido, 200  $\mu\text{M}$  de cada dNTP y 1 unidad de ADN polimerasa (Phusion High-Fidelity DNA polymerase; ThermoFisher Scientific) de acuerdo al programa mostrado en la tabla 7.

Se comprobó la amplificación del gen (2008 pb) por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% utilizando TAE 1x como solución amortiguadora de corrida (Trisma Base 40 mM, ácido acético glacial 20 mM y EDTA 1 mM, pH 8.0). La electroforesis se corrió a 80 V durante 1:15 hrs a temperatura ambiente.

**Tabla 7. Condiciones de la PCR con oligonucleótidos externos GOx.**

Temperatura	Tiempo	Ciclos
98°C	2'	1
98°C	10''	35
55°C	30''	
72°C	1:30'	
72°C	5'	1
4°C	∞	1

El producto de PCR fue purificado utilizando un kit de purificación GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific) y utilizado como templado para una segunda amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos internos que incorporan un sitio de restricción BamHI para permitir la posterior ligación del gen al vector pCWORI (tabla 8).

**Tabla 8. Oligonucleótidos internos para el gen de la GOx.**

Nombre	Secuencia
GOx_FWi	5' CGC GGA TCC ATC GAT GCT TAG GAG GTC ATG AGC AAT GGC AAT GGC ATT GAA GCC AGC CTC CT 3'
GOx_RVi	5' CGC GGA TCC CCT GCA TGG AAG CAT AAT CTT CCA AGA TAG 3'

La amplificación se realizó de acuerdo al programa mostrado en la tabla 9 y utilizando las mismas concentraciones de oligonucleótidos y enzima anteriormente descritas:

**Tabla 9. Condiciones de la PCR con oligonucleótidos internos GOx.**

Temperatura	Tiempo	Ciclos
98°C	2'	1
98°C	10''	35
62°C	30''	
72°C	1:00	
72°C	5'	1
4°C	∞	1

Se comprobó la amplificación del gen (1749 pb) por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% utilizando TAE 1x como solución amortiguadora de corrida. La electroforesis se corrió a 80 V durante 1:15 hrs a temperatura ambiente.

Se utilizó un total de 3 µg del producto de PCR así como del plásmido pCWORI para realizar una digestión con 20 unidades de la enzima BamHI-HF (New England Biolabs; Ipswich, MA, USA) de acuerdo a las especificaciones del proveedor en un volumen de 50 µL durante 16 hrs a 37°C. Al finalizar la digestión, los productos fueron purificados utilizando un kit de purificación GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific) y el plásmido fue tratado con 5 unidades de fosfatasa alcalina de camarón (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 1 hr. a 37°C e inmediatamente después inactivada a 75°C durante 5 min. Finalmente, el vector fue separado en un gel de agarosa al 0.8% con solución amortiguadora de corrida TAE durante 1:15 hrs a temperatura ambiente. La banda de interés fue cortada del gel y purificada utilizando el kit de purificación GeneElute Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Por último, se realizó la ligación entre el producto de PCR digerido y el vector linealizado utilizando 1 unidad de la enzima T4-DNA ligasa (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) con distintas proporciones de vector a inserto (1:1, 1:3, 1:5, 1:7, 1:10) de acuerdo a la fórmula 3:

$$ng \text{ inserto} = \frac{(ng \text{ vector}) * (longitud \text{ (kb)} \text{ inserto})}{longitud \text{ (kb)} \text{ vector}} * \frac{(x) \text{ inserto } k}{(y) \text{ vector } S} \quad (3)$$

La reacción se incubó durante 16 hrs a 16°C para después tomar 10 µL de la ligación y transformar 70 µL de células competentes XL1-Blue (Agilent Technologies) incubando durante 20 min en hielo para posteriormente producir un choque térmico a 42°C durante 1 min. Las células se regresaron a hielo 5 min adicionales y finalmente se agregó 900 µL de medio LB para recuperar las células. La reacción se incubó durante 2 hrs a 37°C y se tomaron 100 µL para sembrar en medio sólido con 200 µg mL<sup>-1</sup> de ampicilina. Los cultivos se incubaron durante 16 hrs a 37°C y finalmente se verificó la presencia de inserto (gen GOx) en distintas colonias tomadas al azar por medio de una PCR de colonia tomando una colonia transformante y diluyendo en 40 µL de H<sub>2</sub>O Milli-Q. Las mezclas se hirvieron durante 10 min y se utilizaron 5 µL como templado para una reacción de 20 µL utilizando los oligonucleótidos FWR\_237 y REV\_1394 diseñados para secuenciar el fragmento entre los nucleótidos 237 y 1394 de la construcción inicial del pCWORI con el gen CYP<sub>BM3</sub>21B3 (tabla 10).

**Tabla 10. Oligonucleótidos para verificar la construcción GOx-CYP<sub>BM3</sub>21B3.**

Nombre	Secuencia
FWR_237	5' CAG GAT CAG CTT ACT CCC CA 3'
REV_1394	5' TCT CCT CCA AGC ACC GTA TC 3'

#### 4.3.3 Clonación de los genes GOx y CYP<sub>BM3</sub>21B3 en el vector pBAD/*myc*-His B

Con base a los resultados obtenidos en las estrategias previas, se procedió a sintetizar el gen que codifica para la GOx proveniente de *A. niger* (IDT; Coralville, IA, USA). A partir de este fragmento se realizó una reacción de PCR utilizando los siguientes oligonucleótidos que incorporan los sitios de restricción XhoI y BamHI en las regiones 5' y 3' respectivamente (tabla 11).

**Tabla 11. Oligonucleótidos para el gen de la GOx incorporando los sitios XhoI y BamHI.**

Nombre	Secuencia
GOxFW_Xho2	5' CCC TCG AGA AAA GAA GCA ATG GCA TCG AAG CCA GCC T 3'
GOxRV_BamHI	5' TTG GAT CCC CTG CAT GGA AGC ATA ATC TTC C 3'

La reacción incluyó 500 pg de templado, 0.2  $\mu$ M de cada oligonucleótido, 200  $\mu$ M de cada dNTP y 1 unidad de ADN polimerasa (Phusion High-Fidelity DNA polymerase; ThermoFisher Scientific) de acuerdo al programa mostrado en la tabla 12:

**Tabla 12. Condiciones de la PCR con oligonucleótidos XhoI y BamHI para la GOx.**

Temperatura	Tiempo	Ciclos
98°C	30''	1
98°C	10''	35
60°C	30''	
72°C	2:00'	
72°C	5'	1
4°C	∞	1

El gen que codifica para el CYP<sub>BM3</sub>21B3 fue amplificado mediante una reacción de PCR tomando como templado el plásmido pCWORI anteriormente descrito. La reacción se realizó utilizando oligonucleótidos que incorporan los sitios de restricción BamHI y XbaI en las regiones 5' y 3' respectivamente (tabla 13).

**Tabla 13. Oligonucleótidos para el gen del CYP<sub>BM3</sub>21B3 incorporando los sitios BamHI y XbaI.**

Nombre	Secuencia
CYP_FW	5' GGG ATC CAT CGA TGC TTA G 3'
CYP_RV	5' GAG TTT TTG TTC TAG ATT AAT GAT GAT GAT GAT GAT GA 3'

La reacción incluyó 500 pg de templado, 0.2  $\mu$ M de cada oligonucleótido, 200  $\mu$ M de cada dNTP y 1 unidad de ADN polimerasa (Phusion High-Fidelity DNA polymerase; ThermoFisher Scientific) de acuerdo al programa mostrado en la tabla 14.

**Tabla 14. Condiciones de la PCR con oligonucleótidos XhoI y BamHI para el CYP<sub>BM3</sub>21B3.**

Temperatura	Tiempo	Ciclos
98°C	30''	1
98°C	10''	35
60°C	30''	
72°C	2:00'	
72°C	5'	1
4°C	∞	1

Se comprobó la amplificación de los genes GOx (1772 pb) y CYP<sub>BM3</sub>21B3 (1439 pb) por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% utilizando TAE 1x como solución amortiguadora de corrida. La electroforesis se corrió a 80 V durante 1:15 hrs a temperatura ambiente.

Se utilizó un total de 2  $\mu$ g de cada producto de PCR (GOx y CYP<sub>BM3</sub>21B3) así como del vector pBAD/myc-His B para realizar una digestión con las enzimas XhoI, BamHI y XbaI (New England Biolabs; Ipswich, MA, USA) de acuerdo a la tabla 15 y siguiendo las especificaciones del proveedor en un volumen de 50  $\mu$ L durante 16 hrs a 37°C.

**Tabla 15. Enzimas de restricción utilizadas para clonar en pBAD/*myc*-His B.**

Enzima	Fragmento		
	GOx	CYP <sub>BM3</sub> 21B3	pBAD/ <i>myc</i> -His B
XhoI	X	-	X
BamHI-HF	X	X	-
XbaI	-	X	X

Al finalizar la digestión, los productos de PCR fueron purificados utilizando un kit de purificación GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific). El vector linearizado fue separado en un gel de agarosa al 0.8% con solución amortiguadora de corrida TAE durante 1:15 hrs a temperatura ambiente. La banda de interés fue cortada del gel y purificada utilizando el kit de purificación GeneElute Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Los productos de PCR digeridos y el vector linearizado fueron ligados utilizando 5 unidades de la enzima T4-DNA ligasa (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) y proporciones de 1:3, 1:5 y 1:7 de vector a inserto respectivamente. La reacción se incubó durante 16 hrs a 16°C para después tomar 10 µL de la ligación y transformar 70 µL de células competentes XL1-Blue de acuerdo a la metodología anteriormente descrita. Finalmente el tamaño de la construcción fue verificado en distintas colonias tomadas al azar por medio de una PCR de colonia utilizando los oligonucleótidos GOx<sub>FW</sub>\_Xho2 y GOx<sub>RV</sub>\_BamHI anteriormente descritos. El plásmido resultante fue enviado a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN (Instituto de Biotecnología, UNAM) para comprobar la incorporación correcta de la construcción GOx-CYP<sub>BM3</sub>21B3.

## 4.4 Nanorreactores a partir del bacteriófago P22

### 4.4.1 Obtención de VLPs P22-CYP<sub>BM3</sub>21B3

Las VLPs con actividad CYP<sub>BM3</sub>21B3 fueron producidas, purificadas y analizadas de acuerdo a Sánchez-Sánchez et al. (2015). Se inició utilizando la cepa de *E. coli* BL21 DE3 pLysS que alberga los plásmidos pBAD CYP-SP y pRSF CP P22 para generar un pre-inóculo de 5 mL en medio de cultivo LB conteniendo 200 y 35 µg mL<sup>-1</sup> de ampicilina y kanamicina, respectivamente y mantenido en agitación a 150 rpm durante 12 hrs a 37°C. Un volumen de 10 mL de pre-inóculo fue sembrado en 1 Lt de medio TB con 05 mM tiamina y

elementos traza como anteriormente descrito. El cultivo fue incubado a 150 rpm durante 7 hrs a 35°C al plazo del cual se indujo la expresión de la fusión CYP-SP adicionando 0.125% L-arabinosa y 1 mM ácido aminolevulínico y se dejó crecer 16 hrs adicionales. Finalmente, se indujo la expresión de la CP adicionando 0.3mM IPTG manteniendo el cultivo a 150 rpm durante 3 hrs y 30°C.

Las bacterias fueron recuperadas por medio de centrifugación a 3,500 rpm durante 10 min a 4°C en una centrífuga Beckman JXN-26 utilizando un rotor JA-14 (Beckman Coulter, Inc.). El paquete bacteriano fue resuspendido en solución amortiguadora de lisis ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM, NaCl 100 mM, pH 7.6) a 10 mL  $\text{g}^{-1}$  de precipitado bacteriano y sonicado como anteriormente descrito para el CCMV. El producto de lisis fue centrifugado a 12,000 rpm durante 45 min y 4°C del cuál fue recuperado el sobrenatante.

El sobrenatante fue ultracentrifugado a 42,240 rpm durante 1 hr. a 4 °C en un rotor de ángulo fijo 50.2 Ti (Beckman Coulter, Inc.) utilizando un colchón de sacarosa al 35% preparado en solución amortiguadora PBS ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM, NaCl 25 mM, pH 7.0). El paquete de VLPs fue resuspendido en aproximadamente 2.5 mL de solución amortiguadora PBS utilizando agitación suave.

Las VLPs fueron separadas por medio de cromatografía por filtración en gel en una columna de filtración HiPrep 16/60 Sephacryl S-500 HR (GE Healthcare) con un flujo de 1 mL  $\text{min}^{-1}$  en solución amortiguadora PBS utilizando un equipo ÄKTA prime plus (GE Healthcare) durante 125 min. Se colectaron las fracciones correspondientes al pico formado a los ~59 min de retención y fueron concentrados por ultracentrifugación como anteriormente descrito (sin utilizar colchón de sacarosa). Las cápsides fueron resuspendidas en Tris-HCl 100 mM, pH 8.0 empleando agitación suave durante 12 hrs a 4°C. Finalmente, la preparación se mantuvo a -20°C hasta su uso.

#### **4.4.2 Deglicosilación de la enzima GOx**

La enzima glucosa oxidasa fue deglicosilada de acuerdo a Courjean et al. (2009) con algunas modificaciones. Se inició purificando 50 mg de GOx comercial (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) disueltos en solución amortiguadora de fosfatos de sodio 20 mM con sulfato de amonio 1 M, pH 7.5 los cuales fueron inyectados a una columna HiTrap Phenyl HP con capacidad de 5 mL pre-equilibrada con la misma solución amortiguadora en un equipo ÄKTA prime plus (GE Healthcare). La enzima fue eluida en un gradiente de sulfato de amonio 1.0 a 0 M. Las fracciones colectadas fueron concentradas mediante ultrafiltración con AMICON a través de una membrana de 30 kDa.

El concentrado de GOx fue inyectado posteriormente en una columna HiTrap Q FF de 1 mL pre-equilibrada con solución amortiguadora de fosfatos de sodio 20 mM a pH 8.0 y fue eluida en un gradiente de 0 a 0.4 M NaCl. Las fracciones colectadas fueron concentradas como anteriormente descrito y dializadas en membrana de corte de 14 kDa contra solución amortiguadora de fosfatos de sodio 30 mM a pH 5.1. La muestra obtenida fue diluida 100 veces y cuantificada por espectrofotometría a 280 nm y un coeficiente de extinción de  $267,200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Brasch et al., 2017) tomando en consideración un peso molecular de 160 kDa.

La enzima purificada fue incubada en 5.55 mL de solución amortiguadora de fosfatos de sodio 30 mM a pH 5.1, 1.5 mL de glicerol y las enzimas comerciales endoglicosidasa H y manosidasa (New England Biolabs) con 1 mL de solución de zinc 10X (incluida con las enzimas) durante 72 hrs a 37°C de acuerdo a las proporciones mostradas en la tabla 16. Se adicionó endoglicosidasa H y manosidasa a las 24 y 48 hrs. Al finalizar el tiempo de incubación, la enzima fue centrifugada a 15,000 x rpm durante 20 min a 4°C (Heraeus Multifuge X1R, Thermo Scientific). El sobrenatante fue filtrado a través de una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  e inyectado a una columna HiTrap Q XL equilibrada con solución amortiguadora de fosfatos de sodio 10 mM, pH 6.0 en donde se eluyó contra la misma solución adicionada con 1 M NaCl. Las fracciones colectadas fueron concentradas a 1 mL en AMICON con membrana de 30 kDa y dializadas contra solución amortiguadora de fosfatos de sodio 30 mM, pH 5.1. La GOx deglicosilada fue después almacenada a -20°C hasta su uso.

**Tabla 16. Enzimas utilizadas para deglicosilar GOx.**

Enzima	Cantidad de enzima utilizadas (en unidades)			
	Inicial	24 hrs	48 hrs	Total
Manosidasa	6 U	3.3 U	3.3 U	12.6 U
Endoglicosidasa H	20 mU	16.6 mU	16.6 mU	53.2 mU

#### 4.4.3 Funcionalización de las VLPs P22-CYP<sub>BM3</sub>21B3 con GOx

62.5 nmoles de GOx fueron mezclados con EDC (782.5 nmoles) y NHS (868.9 nmoles) en solución amortiguadora PBS, pH 5.5 con agitación suave durante 30 min a temperatura ambiente. La solución fue ultrafiltrada en AMICON con una membrana de 50 kDa para remover el exceso de EDC y NHS. La solución se mezcló con 10 mg de las VLPs conteniendo 74.6 nmoles de EDC y NHS en solución amortiguadora PBS, pH 8.0 en un volumen final de 10 mL. La reacción se mantuvo en agitación suave durante 2 hrs a

temperatura ambiente y después ultracentrifugada a 40,000 rpm durante 90 min a 4°C en un rotor SW41 Ti (Beckman Coulter, Inc.). La solución fue resuspendida en solución amortiguadora de PBS, pH 7.4 a una concentración final de 2.0 mg mL<sup>-1</sup>.

#### **4.4.4 Medición de la actividad enzimática**

La actividad enzimática de las VLPs P22-CYP<sub>BM3</sub>21B3-GOx se midió espectrofotométricamente como descrito en el apartado 4.1.9. En aquellas preparaciones donde hubo mayor interés, se cuantificó la proteína total mediante ensayos de Bradford y se compararon las curvas de actividad de las VLPs con las curvas obtenidas utilizando enzima libre para calcular la cantidad de enzima presente al interior y exterior de las cápsides.

#### **4.4.5 Determinación de constantes catalíticas**

Las constantes catalíticas,  $K_M$  y  $k_{cat}$  fueron obtenidas utilizando glucosa como sustrato. La mezcla de reacción contenía 355.7 µg de nanorreactores y una concentración fija de DMP como anteriormente descrito para los ensayos de actividad. La concentración de glucosa fue variando de 0 a 95 µM y la actividad fue monitoreada espectrofotométricamente a 468 nm (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific).

#### **4.4.6 Transformación de disruptores endocrinos**

La capacidad de transformación de los DEs bisfenol A (BPA), 17-β-estradiol (E2), nonilfenol (NPh), resorcinol y triclosano (TCS) mediante la CYP<sub>BM3</sub>21B3 fue analizada por cromatografía líquida de alta resolución (por sus siglas en inglés “High Performance Liquid Chromatography”) en un equipo Agilent serie 1100 utilizando una columna Ascentis C18 de fase reversa (Supelco, 150 x 4.6 mm, 3 µm). En primer instancia se evaluó la capacidad de transformación por el citocromo libre y se procedió a evaluar los nanorreactores únicamente en aquellos casos donde se detectó transformación.

Se elaboraron soluciones madre de cada DE en acetonitrilo a una concentración de 1 mM, con excepción del TCS que fue disuelto en metanol. Las mezclas de reacción contenían 1.26 µmoles de CYP<sub>BM3</sub>21B3 y 100 µM del disruptor endocrino en Tris-HCl 50 mM, pH 8.0. Las reacciones iniciaron con la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 mM y se evaluó el porcentaje de transformación a los 30 min. En los casos donde se detectó

transformación del DE, se procedió a evaluar al nanorreactor agregando 355.6  $\mu\text{g}$  en Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 conteniendo glucosa 95 mM y 100  $\mu\text{M}$  del DE. Las transformaciones fueron evaluadas cada 30 min durante 2 hrs.

Las muestras fueron eluidas isocráticamente de acuerdo a las condiciones mostradas en la tabla 17. Todos los solventes utilizados fueron mezclados con 0.1% de ácido trifluoroacético y filtrados a través de membranas de nylon de 0.22  $\mu\text{m}$ .

**Tabla 17. Condiciones analíticas utilizadas.**

Columna	Fase reversa, Supelco C <sub>18</sub> (150 x 4.6 mm, 3 $\mu\text{m}$ )				
Temperatura	25°C				
Flujo	0.5 mL min <sup>-1</sup>				
Volumen inyectado	20 $\mu\text{L}$				
Modo de operación	Elución isocrática				
	Composición de la fase móvil (%)			Longitud de onda (nm)	
Muestra	A	B	C	UV	
	(Agua)	(Acetonitrilo)	(Metanol)		
Estradiol	30	35	35	280	
Resorcinol	60	40	-	273	
Triclosano	30	70	-	284	
				Fluorescencia	
				Excitación	Emisión
Bisfenol A	50	50	-	275	313
Nonilfenol	20	80	-	222	305

#### 4.4.7 Identificación de los productos de transformación

En todos los casos donde se observó una transformación de los disruptores endocrinos se procedió a escalar las reacciones de transformación para analizar los productos mediante espectrofotometría de masas (Molecular Mass Spectrometry Facility, University of California at San Diego). Cada reacción contenía 100  $\mu\text{M}$  del DE, 1.26  $\mu\text{moles}$  de CYP y 3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en solución amortiguadora de fosfato de sodio, pH 8.0. Las reacciones se mantuvieron durante 30 min y se agregaron 1.26  $\mu\text{moles}$  de CYP y 3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adicionales. Al plazo de 30 min las reacciones fueron liofilizadas (Virtis, Freezemobile 12EL), resuspendidas en acetona y filtradas a través de fibra de vidrio. Las fracciones líquidas fueron secadas bajo flujo de nitrógeno y almacenadas a -20°C hasta ser analizadas por nLC-MS (Agilent 1260 acoplado a un espectrómetro LCQdecamass, Thermo). La fuente de ionización fue operada bajo ionización negativa utilizando una

columna Waters XBridge BEH C18 (50 x 2.1 mm, 2.5  $\mu\text{m}$ ). La separación se realizó utilizando agua con 0.1% ácido fórmico como la fase A y acetonitrilo como la fase B con un flujo de 0.3 mL  $\text{min}^{-1}$ .

#### **4.4.8 Microscopía electrónica de transmisión**

Se colocó una muestra de 10  $\mu\text{L}$  de cápsides con actividad CYP o bien, nanorreactores P22-CYP-GOx a una concentración de 0.1 mg  $\text{mL}^{-1}$  sobre una rejilla de cobre cubierta con Formvar (TedPella, USA). Las muestras se prepararon de acuerdo a lo descrito en el apartado 4.2.5.

## Capítulo 5. Resultados y discusión

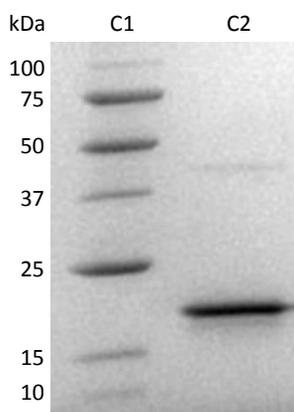
---

### 5.1 Co-encapsidación de GOx y CYP<sub>BM3</sub>21B3

#### 5.1.1 Purificación del virus y proteínas de cápside del CCMV

La infección de las plantas de frijol caupí con el virus del CCMV generó un patrón de clorosis muy evidente a partir de la segunda semana posterior a la infección lo cual dio pauta a cosechar las hojas a partir de la base de la lámina foliar. Las hojas fueron utilizadas para extraer virus nativo de acuerdo al protocolo anteriormente descrito. La pureza y concentración de las muestras fue determinada mediante espectrofotometría UV-vis únicamente haciendo uso de aquellas muestras en donde se obtuvieron razones de  $A_{280}/A_{260}$  mayores o iguales a 1.5. El rendimiento de virus nativo obtenido fue de 260  $\mu\text{g}$  por cada gramo de hoja procesado y fue almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  en alícuotas de  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  hasta ser desensamblado para obtener CP libre de ácidos nucleicos.

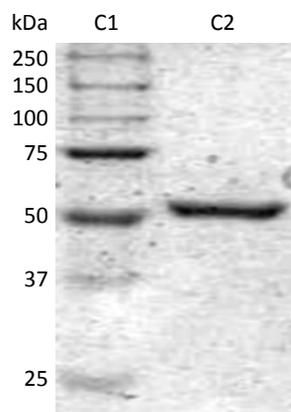
Las alícuotas de virus nativo fueron desensambladas, ultracentrifugadas y separadas en fracciones de 400  $\mu\text{L}$  para ser analizadas mediante espectrofotometría UV-vis. Todas aquellas fracciones en donde se obtuvieron valores de  $A_{280} \geq 0.1$  y razones de  $A_{280}/A_{260} \geq 1.5$  fueron colectadas y dializadas contra solución amortiguadora de suspensión de virus para estabilizar los dímeros purificados y pueden ser observadas en la figura 1. El rendimiento de proteína de cápside recuperado fue cercano al 60% de la masa inicial de virus nativo utilizado en los desensambles.



**Figura 1.** Electroforesis en gel de poliacrilamida de la CP CCMV. C1) Marcador de peso molecular y C2) CP CCMV.

### 5.1.2 Expresión y purificación del CYP<sub>BM3</sub>21B3

El vector de expresión que codifica para el CYP<sub>BM3</sub>21B3 presenta una etiqueta de histidinas en la región C terminal de la proteína para facilitar su purificación. El citocromo fue expresado de manera heteróloga en *E. coli* y purificado mediante cromatografía de afinidad. En la figura 2 se muestra el CYP<sub>BM3</sub>21B3 obtenido y separado a través de un gel de electroforesis desnaturante en acrilamida al 12% en donde se logra observar una banda bien definida y con alto grado de pureza cercana al marcador de los 50 kDa.



**Figura 2. CYP<sub>BM3</sub>21B3 purificado.** C1) Marcador de peso molecular y C2) CYP<sub>BM3</sub>21B3.

La concentración de enzima producida alcanzó 46.4  $\mu\text{M}$ . Así mismo, se evaluó la concentración de enzima activa monitoreando el cambio en absorbancia generado al unir CO en el sitio activo del CYP a 420 nm y alcanzó los 29.6  $\mu\text{M}$  correspondientes al 63.8% de la proteína total. Finalmente, se calculó el valor  $R_z$  este fue igual a 1.02 indicando un alto grado de pureza. El valor  $R_z$  mide la relación entre la absorbancia a 420 nm correspondiente al grupo hemo del citocromo y la absorbancia a 280 nm correspondiente a los residuos aromáticos de la proteína total presente en el medio.

### 5.1.3 Determinación de las constantes catalíticas del CYP<sub>BM3</sub>21B3 y la GOx

Las constantes catalíticas aparentes,  $k_{\text{cat}}$  y  $K_M$  del CYP<sub>BM3</sub>21B3 fueron obtenidos evaluando la oxidación del DMP en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 468 nm. Los valores obtenidos se muestran en la tabla 18 y es importante mencionar que únicamente se consideró la concentración de enzima activa para los cálculos. Las constantes se consideraron aparentes debido a que no se logró alcanzar una concentración saturante de

peróxido de hidrógeno antes de presenciar la inactivación de la enzima a concentraciones mayores a 60 mM como reportado anteriormente por Cirino y Arnold, (2003b).

**Tabla 18. Constantes catalíticas del CYP<sub>BM3</sub>21B3.**

Enzima	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_M$ ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ; mM)	$k_{cat} K_M^{-1}$ ( $\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ )
CYP <sub>BM3</sub> 21B3	720.5	18.5	38.9

La enzima glucosa oxidasa fue resuspendida a una concentración de 50 mg mL<sup>-1</sup> en solución amortiguadora acetato de sodio 50 mM y a partir de esta solución se realizaron ensayos de actividad para medir la oxidación de guaiacol en presencia de peroxidasa de rábano picante y glucosa a 470 nm. Los valores obtenidos fueron utilizados para determinar las constantes catalíticas de la enzima libre que se presentan en la tabla 19.

**Tabla 19. Constantes catalíticas de la GOx.**

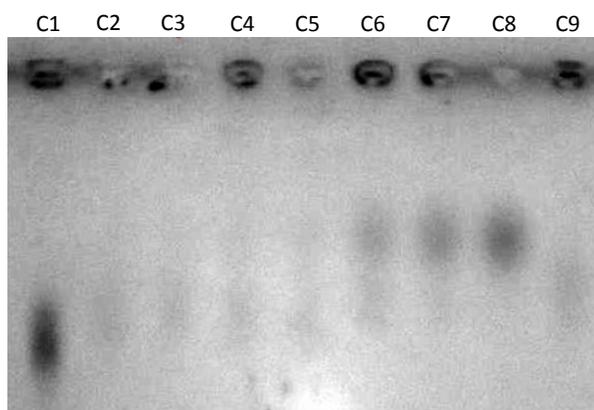
Enzima	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_M$ (glucosa; mM)	$k_{cat} K_M^{-1}$ ( $\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ )
GOx	10,400	17.2	604.7

#### 5.1.4 Encapsidación de enzimas en VLPs del CCMV

Se realizó un ensayo de encapsidación para determinar la razón ideal a la que la proteína de cápside y la GOx se encapsidaba de manera óptima. Las VLPs del CCMV fueron desensambladas y re-ensambladas en presencia de las distintas proporciones de la enzima. Las VLPs del CCMV presentan un peso molecular significativamente mayor a las enzimas utilizadas y por ello tienden a formar un precipitado más rápidamente al ser ultracentrifugadas lo cual puede ser de gran utilidad para separar la enzima libre de aquellas que se encuentren encapsidadas. Una vez que las preparaciones fueron ensambladas, se procedió a eliminar la GOx libre por medio de ultracentrifugación colocando los ensambles sobre la superficie de un colchón de solución amortiguadora de ensamblado. Se agregó un control de GOx libre a la máxima concentración utilizada en los ensambles. De acuerdo a la fórmula 2 los tiempos de sedimentación de la GOx y el CYP<sub>BM3</sub>21B3 utilizando el rotor 90-Ti (Beckman Coulter, Inc.) son 12:35 y 10:54 hrs respectivamente. Tomando en cuenta que las VLPs del CCMV precipitan en 1:30 hrs, la ultracentrifugación se realizó durante 3:00 hrs y se procedió a analizar la actividad GOx en los sobrenatantes así como el botón

de VLPs formado en la preparación con ensambles. En ambos casos hubo actividad GOx en el sobrenatante, no obstante, no fue posible detectar actividad en el fondo del tubo con el control de GOx en contraste con lo encontrado en el tubo con los ensambles, indicando que la ultracentrifugación fue un buen método para separar enzima libre de la encapsidada.

Las VLPs formadas fueron analizadas mediante un ensayo de cambio en movilidad electroforética en gel nativo de agarosa al 1% utilizando una solución amortiguadora de virus con el propósito de evaluar la migración de los complejos proteicos con relación al virus nativo del CCMV, la proteína de cápside del CCMV y la GOx libre. El gel fue teñido con el colorante InstantBlue y los resultados se muestran en la figura 3.



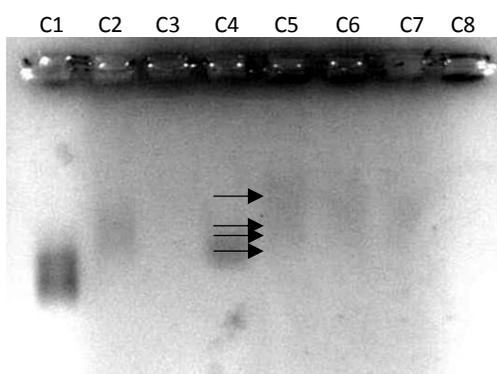
**Figura 3. Ensayo de movilidad electroforética de la encapsidación de GOx.** C1) CCMV nativo. C2-C7) Proporción de CP CCMV: GOx utilizada en el ensamble: C2) 12:1; C3) 8:1; C4) 6:1; C5) 3:1; C6) 1:1; C7) 1:2. C8) GOx. C9) CP CCMV.

El peine del gel fue colocado en la parte media de la charola y es posible apreciar que en todos los casos las muestras migraron hacia la parte inferior del gel correspondiente al polo positivo. La banda de mayor intensidad observada en los carriles 2-5 (banda inferior) corresponde a las VLPs conteniendo GOx al interior y si bien las intensidades relativas de estas bandas son similares, es posible observar que en el carril 2 únicamente hay una banda con una migración muy similar a la observada en el virus nativo (carril 1). A partir del carril 3 y hasta el 7 se observa una banda superior correspondiente a GOx no encapsidada. Con base a estos resultados se establecieron dos puntos importantes: 1) la encapsidación de glucosa oxidasa dentro las VLPs del CCMV es posible y 2) la proporción óptima para encapsidar GOx es de 12 proteínas de cápside por glucosa oxidasa utilizada.

Con base a los resultados anteriores se procedió a realizar una electroforesis en gel desnaturalizante de acrilamida utilizando VLPs ensambladas con una proporción de 12 CPs CCMV por GOx. El gel nos permitió

observar dos bandas correspondientes a los pesos moleculares de la CP CCMV y GOx. Así mismo, los análisis de densitometría efectuados con el programa ImageJ (NIH) dieron como resultado un promedio de 1.17 enzimas por cápside. De acuerdo a Hecht et al. (1993) el dímero cristalizado de la GOx presenta unas dimensiones de 6 x 5.2 x 7.7 nm. Estos valores son similares a los reportados por Shenoy y Bowman (2012) así como Courjean et al. (2009) quienes definen el radio hidrodinámico de esta enzima en 4.3 nm y 4.45 nm respectivamente. De acuerdo a estos datos, el volumen promedio de la GOx es igual a 333.0 nm<sup>3</sup> y tomando en cuenta que el volumen interno de las VLPs del CCMV es de 4711 nm<sup>3</sup> (Sánchez-Sánchez et al., 2014), el porcentaje de ocupación fue de alrededor del 8.3%.

Se realizaron una serie de ensayos de co-encapsidación de la GOx y el CYP<sub>BM3</sub>21B3 dentro de las VLPs del CCMV de acuerdo a las proporciones mostradas en las tablas 2 y 3. No fue posible encontrar una proporción enzimática ideal que produjera una banda con migración similar al virus nativo tan evidente como en los ensayos con GOx. Inclusive, en algunos de los ensambles no se pudieron detectar las bandas de proteína por lo que en la figura 3 únicamente se muestran los ensambles correspondientes a las proporciones de la tabla 4. En el único carril donde es posible observar un banda tenue correspondiente a las VLPs es en el 5, no obstante, la banda con mayor intensidad corresponde a la CP CCMV. En los cuatro ensambles mostrados (carriles 5-8) es posible apreciar una banda ancha que va disminuyendo en tamaño de izquierda a derecha. Este comportamiento coincide con la concentración de GOx utilizado en cada ensamble, la cual varió de 50 a 200 ng cargados en el gel, y es por ello que en los carriles 7 y 8 únicamente se observan las bandas correspondientes al CYP<sub>BM3</sub>21B3 y la CP CCMV. La proporción de controles enzimáticos cargadas en el gel fue muy bajo con respecto a la CP CCMV (0.13 µg GOx, 0.70 µg CYP<sub>BM3</sub>21B3, 2.38 µg CP CCMV) lo que podría explicar la aparente ausencia de bandas enzimáticas sobre los carriles 5-8.



**Figura 3. Ensayo de movilidad electroforética de la coencapsidación de GOx y CYP<sub>BM3</sub>21B3.** C1) CCMV nativo. C2) CP CCMV. C3) GOx. C4) CYP<sub>BM3</sub>21B3. C5-C8) Proporción de CP CCMV: GOx utilizada en el ensamble: C5) 12:1; C6) 16:1; C7) 24:1. C8) 48:1. La proporción CP CCMV a CYP<sub>BM3</sub>21B3 se mantuvo fija a 12:1 respectivamente. Las flechas indican GOx, CP CCMV, VLPs y CYP<sub>BM3</sub>21B3 de arriba hacia abajo respectivamente.

### 5.1.5 Actividad enzimática de los nanorreactores

Se realizaron ensayos de actividad enzimática GOx, CYP<sub>BM3</sub>21B3 así como la cascada enzimática activada por glucosa para evaluar la capacidad catalítica de las VLPs CCMV-GOx—CYP<sub>BM3</sub>21B3. Fue posible observar VLPs catalíticamente activas al evaluar la actividad GOx y CYP<sub>BM3</sub>21B3 por separado utilizando glucosa y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respectivamente, sin embargo, no fue posible observar una reacción en cascada al utilizar glucosa para la activación los nanorreactores (figura 4). Es importante mencionar que las mediciones de actividad se realizaron sobre preparaciones distintas y en ningún caso se observó actividad de ambas enzimas en una sola preparación.

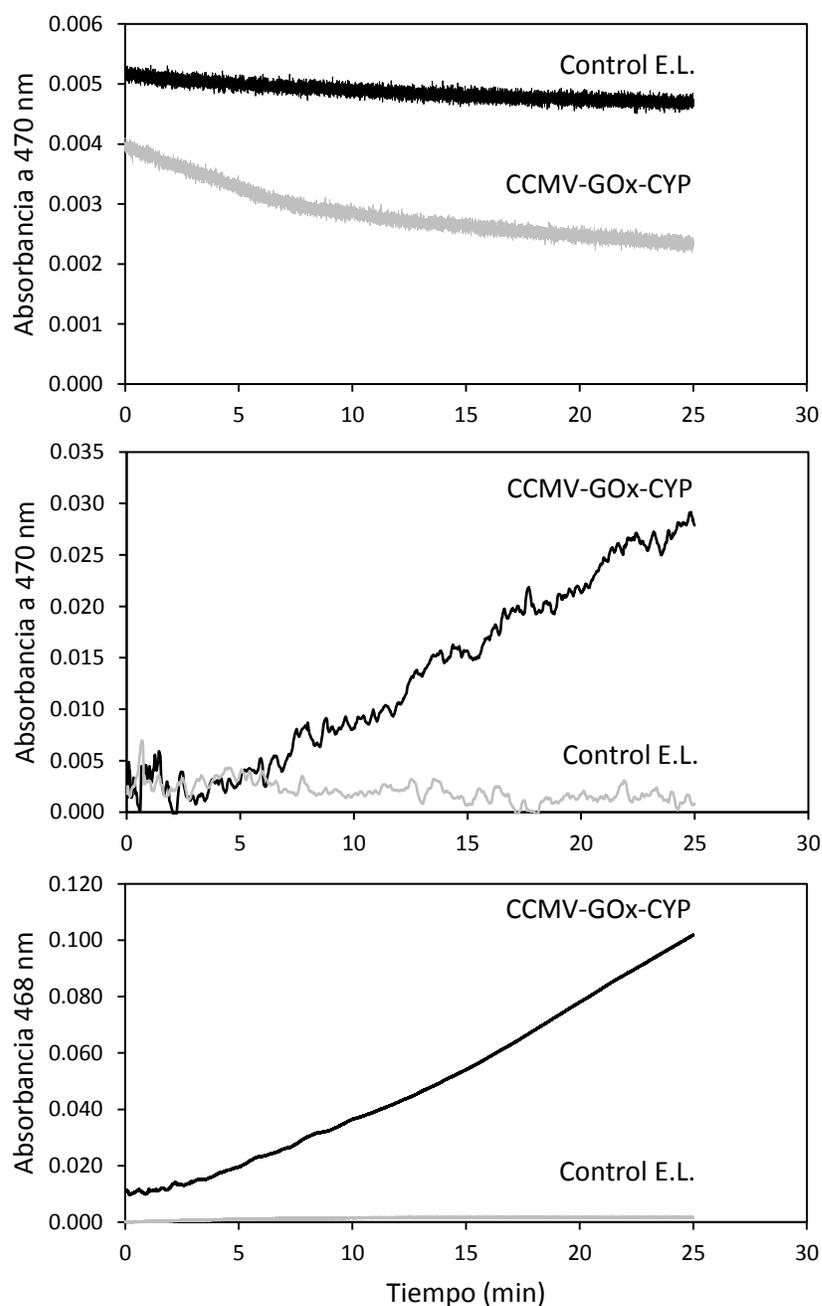
Si bien una de las principales ventajas de utilizar las VLPs del CCMV para encapsidar las enzimas utilizadas en este proyecto es el hecho de que la superficie interna del virus presenta una carga positiva que permite la interacción electrostática con las cargas negativas presentes sobre la superficie de la GOx y el CYP<sub>BM3</sub>21B3 bajo las condiciones de ensamblado utilizadas, los resultados obtenidos indican que la repulsión de cargas entre ambas enzimas es mayor a la atracción que existe hacia el interior de la cápside. Esta teoría está apoyada con el hecho de que el porcentaje de ocupación de la cápside por la GOx es de solamente el 8.3% y tomando en cuenta que Sánchez-Sánchez et al. (2014) reportan un porcentaje de ocupación de 45% con el CYP<sub>BM3</sub>21B3, el espacio disponible al interior de la cápside no parece ser un impedimento. Adicionalmente, el hecho de que las cápsides presentaran actividad monoenzimática y en ningún caso se observara actividad de ambas enzimas en una misma preparación descarta la posibilidad de tener VLPs con ambas enzimas coencapsidadas en proporciones desequilibradas que pudieran estar inactivando al CYP<sub>BM3</sub>21B3 (Valderrama et al., 2002) o bien, en caso contrario y menos probable, generando concentraciones muy bajas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que no logran activar al mismo.

## 5.2 Nanopartículas de ZnO y TiO<sub>2</sub>

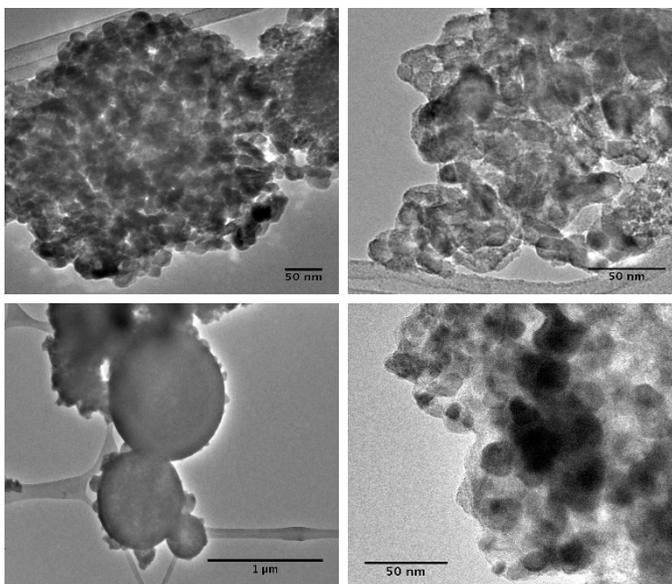
### 5.2.1 Funcionalización enzimática

La funcionalización de las nanopartículas inorgánicas se realizó con éxito ya que fue posible observar una oxidación del DMP en presencia de glucosa. No obstante, el diámetro hidrodinámico de las partículas incrementó al orden micrométrico una vez finalizada la aminación de la superficie y no fue posible dispersar los aglomerados a partículas por debajo de los 200 nm de diámetro sin utilizar soluciones

dispersantes que inactivaran a las enzimas. Estos datos fueron corroborados por TEM y se muestran en las figuras 5 y 6.



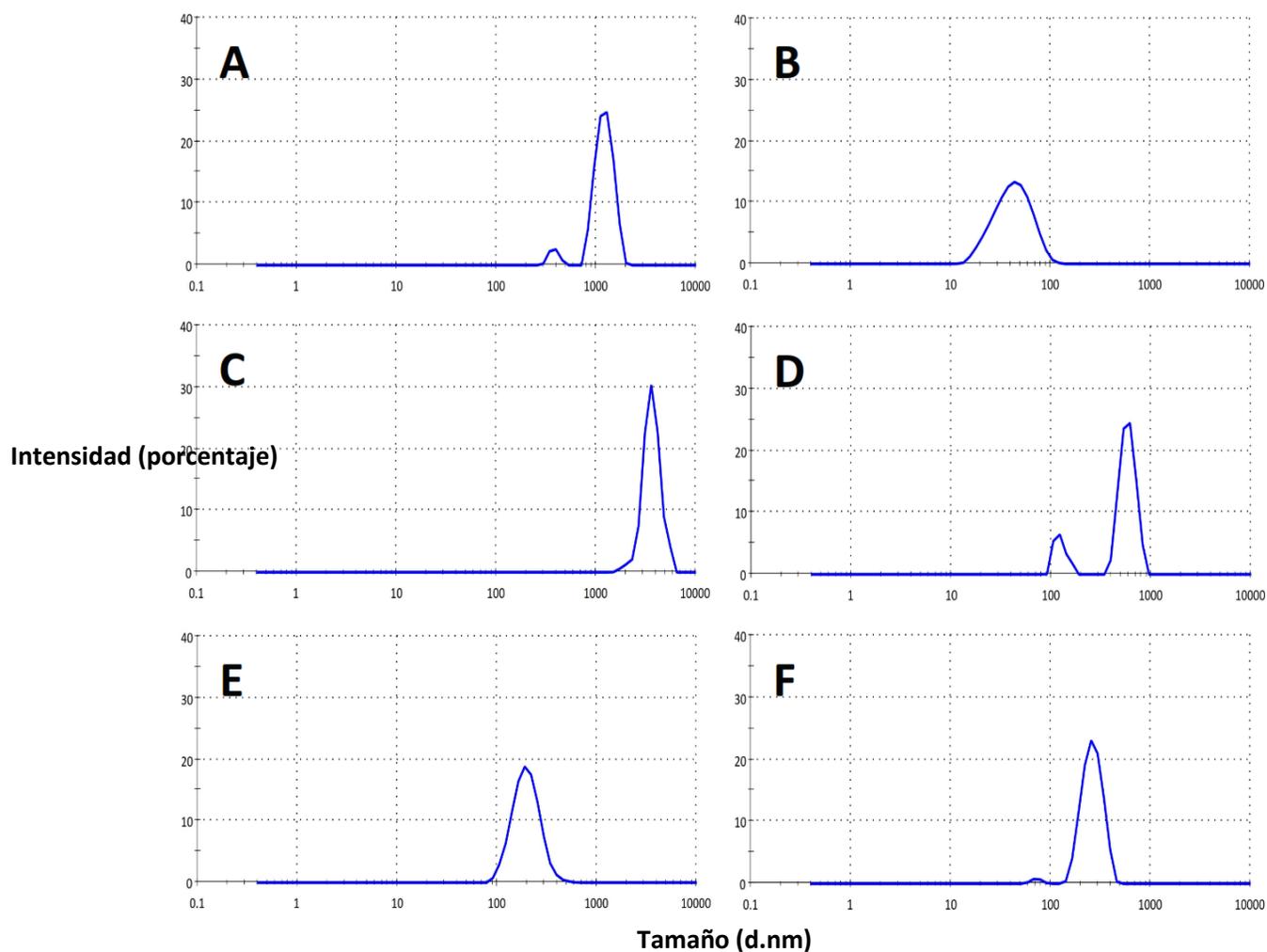
**Figura 4. Actividad enzimática de los nanorreactores CCMV-GOx-CYP<sub>BM3</sub>21B3.** A) Cascada enzimática utilizando glucosa como sustrato. B) Actividad CYP<sub>BM3</sub>21B3 utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y DMP. C) Actividad GOx utilizando glucosa y guaiacol. Control E.L.: centrifugado de enzimas libres en colchón de amortiguador de ensamble. CCMV-GOx-CYP: ensamble de CP CCMV con GOx y CYP<sub>BM3</sub>21B3. Las curvas representan mediciones realizadas en preparaciones distintas; en ningún caso se observó actividad de ambas enzimas en una sola preparación.



**Figura 5. Nanopartículas de ZnO-GOx-CYP<sub>BM3</sub>21B3 observadas al TEM.**

El comportamiento de distintas nanopartículas inorgánicas en soluciones acuosas depende de su tamaño. La mayoría de las NPs tienden a formar agregados cuando están hidratadas, lo cual a su vez produce un efecto significativo en sus tasas de sedimentación. En adición, la fuerza y composición iónica así como pH del sistema pueden modificar o enmascarar la carga superficial de las nanopartículas generando un desbalance entre las fuerzas atractivas y repulsivas que controlan su agregación así como su interacción con otras moléculas en el ambiente en que se encuentren (Keller et al., 2010). La formación de aglomerados reduce las propiedades fisicoquímicas de estos materiales por lo que para tratar de propiciar la dispersión homogénea de las nanopartículas y de esta forma aumentar la compatibilidad entre éstas y las moléculas con las que se desee interactuar, se ha propuesto el uso de distintos agentes acoplantes que modifiquen la superficie de las nanopartículas generando interacciones tanto físicas como químicas que faciliten su acoplamiento (Jordan et al., 2005; Li et al., 2007; X. Xu et al., 2007).

En este trabajo se utilizaron dos metodologías distintas para aminorar la superficie de las nanopartículas y poder inmovilizar la GOx y el CYP<sub>BM3</sub>21B3 sobre ellas. Ambos protocolos utilizaron APTES como agente acoplante y se obtuvieron resultados muy similares en cuanto a la actividad enzimática. No obstante, el tamaño de las nanopartículas ya aminadas y previo a la funcionalización enzimática incrementó significativamente; en el caso de las NPs de ZnO el diámetro hidrodinámico se triplicó de 1237 a 3805 nm, así mismo, el diámetro de las NPs de TiO<sub>2</sub> aumentó de 46 a 758 nm.



Preparación	Diámetro (nm)			Índice polidispersión
	Promedio	Pico 1	Pico 2	
A	1315	1224 ± 239.9	379.6 ± 42.33	0.325
B	38.28	44.92 ± 18.34	0.0	0.147
C	3543	3661 ± 748.9	0.0	0.038
D	471.4	590.7 ± 104.0	125.0 ± 18.31	0.510
E	192.2	204.0 ± 65.04	0.0	0.157
F	244.4	265.9 ± 60.26	72.55 ± 8.74	0.145

**Figura 6. Diámetro hidrodinámico promedio de las nanopartículas-GOx-CYP<sub>BM3</sub>21B3.** A) Nanopartículas de TiO<sub>2</sub> previo a la aminación. B) Nanopartículas de ZnO previo a la aminación. C) Nanopartículas de TiO<sub>2</sub> aminadas. D) Nanopartículas de ZnO aminadas. E) Nanopartículas de TiO<sub>2</sub> funcionalizadas con GOx y CYP<sub>BM3</sub>21B3 y resuspendidas en PVP. F) Nanopartículas de TiO<sub>2</sub> funcionalizadas con GOx y CYP<sub>BM3</sub>21B3 y resuspendidas en goma de xantana. Todas las preparaciones fueron sonificadas durante 30 min como descrito en la metodología.

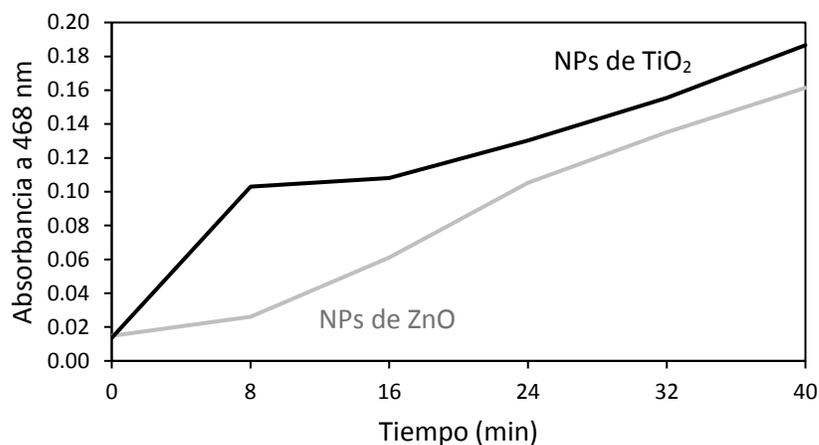
Se han empleado múltiples metodologías para tratar de contrarrestar la aglomeración de nanopartículas, entre ellas el uso de fuerzas mecánicas como el ultrasonido es una de las principales vías para romper estos aglomerados (Xia y Wang, 2003; Mirabedini et al., 2008). En contraste con lo reportado, nuestros resultados difieren ya que el sonicado no redujo el diámetro hidrodinámico promedio en ninguno de los tratamientos analizados, incluso utilizando protocolos de media hora continua (figura 6; c-f). No obstante, es interesante indicar que en las preparaciones sonicadas el tamaño de los aglomerados presentó una distribución homogénea en comparación con las preparaciones analizadas sin haber sonicado (figuras no mostradas) en donde hubo múltiples picos.

Ambas nanopartículas aminadas fueron funcionalizadas con GOx y CYP<sub>BM3</sub>21B3. En adición a los protocolos de sonicación, se procedió a resuspender las preparaciones en una solución de PVP así como goma de xantana con la intención de inhibir la reactividad de residuos disponibles y reducir la formación de agregados (Faure et al., 2013; Yuliah et al., 2016). Como puede observarse en la figura 6 (e-f), el diámetro hidrodinámico promedio de las partículas de TiO<sub>2</sub> disminuyó entre un 27 y 33% al resuspenderlas en la solución de PVP y goma de xantana respectivamente, desafortunadamente el tamaño resultante aún estaba muy grande (entre 206 y 255 nm).

### 5.2.2 Medición de la actividad enzimática

Con el propósito de hacer una aproximación de la cantidad de enzima inmovilizada se hicieron mediciones de actividad enzimática utilizando tanto las nanopartículas funcionalizadas como el sobrenatante obtenido al hacer la centrifugación para separar enzima libre. En el caso de las preparaciones de ZnO, se obtuvo alrededor de un 21% de actividad sobre las nanopartículas, correspondientes a 1.315 nmoles de proteína total. Así mismo, en la preparación de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> alrededor de un 33% de la actividad total estaba sobre las nanopartículas (2.047 nmoles).

Estos datos son interesantes dado que a pesar de tener un incremento cercano a 12% en la funcionalización de las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> y por tanto una pendiente inicial aproximadamente 5 veces mayor que la encontrada con las partículas de ZnO (basándose en los valores de absorbancia obtenidos), las curvas presentan la misma tendencia y los cambios de absorbancia son muy similares entre los 24 y 48 min de reacción, lo que podría interpretarse como una posible inactivación de citocromo a consecuencia de la elevada producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (figura 7). Aun cuando se logró obtener una reacción en cascada activada por glucosa, el tamaño de las partículas obtenidas así como la incapacidad de disgregar los aglomerados fue una limitante que no permitió continuar evaluando esta estrategia.



**Figura 7. Actividad enzimática de las NPs de ZnO y TiO<sub>2</sub> funcionalizadas con GOx-CYP<sub>BM3</sub>21B3.** Cascada enzimática iniciada agregando glucosa como sustrato.

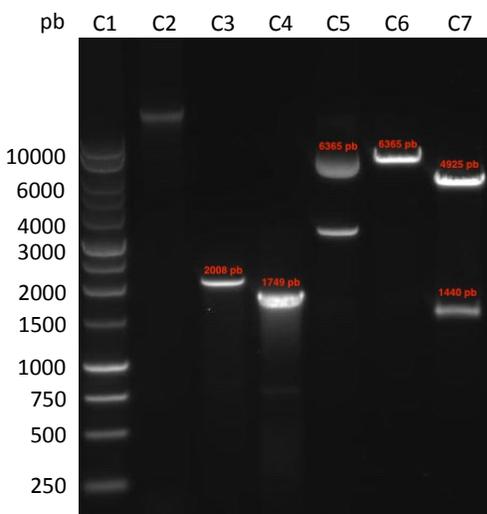
### 5.3 Proteína de fusión GOx-CYP<sub>BM3</sub>21B3

#### 5.3.1 Clonación del gen de la GOx en el vector pCWORI

Los resultados de las amplificaciones del gen que codifica para la GOx así como la extracción del plásmido pCWORI y su digestión con la enzima BamHI se muestran en la figura 8. Sobre el carril 2 se puede observar una banda correspondiente al ADN genómico de *A. niger*, así mismo, en los carriles C3 y C4 hay dos productos de amplificación del fragmento de la GOx utilizando el par de oligonucleótidos externos e internos respectivamente así como el ADN genómico mostrado en el C2. En ambos casos, las bandas observadas están muy cercanas al tamaño de fragmento esperado; 2008 pb al amplificar el fragmento externo y 1749 pb al amplificar el producto anidado. Es importante mencionar que en todos los casos las muestras y no el gel, fueron mezcladas con el marcador fluorescente GelRed lo que ocasiona que los fragmentos migren un poco más lento con respecto al marcador de peso molecular. Esto es más notorio al analizar los carriles 5-7 como se explica a continuación.

Los últimos tres carriles del gel se cargaron las muestras correspondientes al vector pCWORI conteniendo el gen que codifica para el dominio hemo del CYP<sub>BM3</sub>21B3. Se realizó una extracción del vector utilizando el kit de purificación GeneElute Plasmid miniprep Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). De acuerdo al mapa del vector, el plásmido tiene una longitud de 6365 pb. En el gel pueden observarse dos bandas: la de mayor tamaño presenta una longitud cercana a los 7000 pb y la menor está cercana a los 4000 pb. La presencia

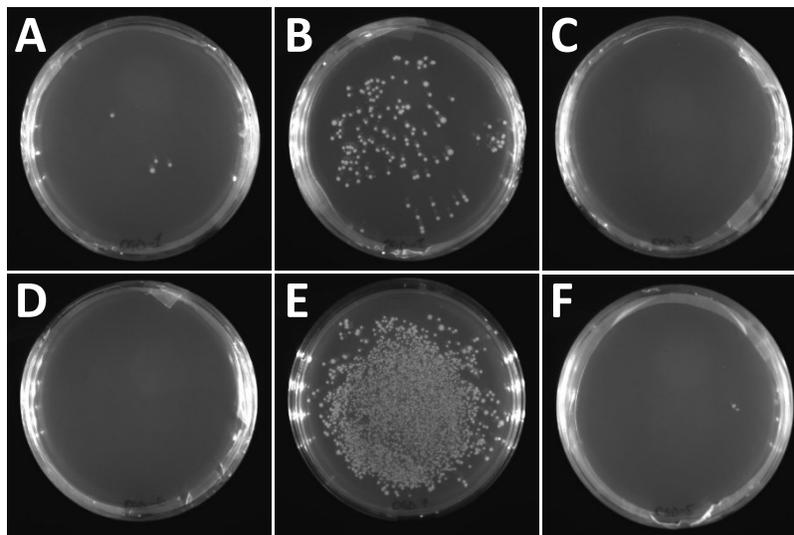
de dos bandas sobre el carril es atribuido a la desnaturalización de plásmido, lo que genera un grupo de plásmido linearizado (la banda cercana a 7000 pb) y un segundo grupo de plásmido superenrollado (cercano a los 4000 pb). Para corroborar estos datos, se realizó una digestión del vector utilizando la enzima BamHI la cual reconoce la secuencia entre los nucleótidos 334-339. El producto de digestión fue cargado en el carril C6 y solamente se observó una banda indicando una digestión total del vector. Adicionalmente, el fragmento generado muestra un tamaño muy similar a lo encontrado en la banda correspondiente al plásmido desnaturalizado en el carril 5. Finalmente, se realizó una doble digestión utilizando las enzimas BamHI y EcoRI. Esta segunda enzima produce un corte en el nucleótido 1774 que da lugar a la generación de dos bandas; una correspondiente al vector con una longitud aproximada de 4925 pb y una correspondiente al fragmento del citocromo (1440 pb).



**Figura 8. Gel de agarosa con el fragmento GOx y el vector purificado pCWORI.** C1) Marcador de peso molecular. C2) ADN genómico de *A. niger*. C3) Fragmento GOx amplificado con oligonucleótidos externos. C4) Fragmento de GOx amplificado con oligonucleótidos internos. C5) Vector pCWORI. C6) Vector pCWORI linearizado con BamHI. C7) Doble digestión del vector pCWORI con BamHI y EcoRI.

El vector fue linearizado utilizando BamHI debido a que no se contaba con sitios de restricción adicionales que fueran compatibles con el fragmento de GOx por insertar. La idea entonces fue mantener la secuencia de aminoácidos 5' HRCLGGH 3' previo a la metionina de inicio para el CYP<sub>BM3</sub>21B3 y éstas, junto con los aminoácidos glicina e isoleucina en la región carboxilo terminal de la GOx (provenientes de la amplificación interna del gen que codifica para la GOx) darían lugar a la secuencia 5' GIHRCLGGH 3' que serviría como péptido de unión entre ambos dominios catalíticos de la proteína de fusión.

El vector digerido fue tratado con fosfatasa alcalina con el propósito de evitar su religación e inmediatamente después fue separado en un gel de agarosa del cual se recuperó la banda correspondiente al vector linearizado utilizando el kit “GeneElute Gel Extraction Kit” (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). El fragmento interno de GOx fue purificado a través de columna utilizando el kit “GeneElute PCR Purification Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Finalmente, el vector linearizado y el fragmento interno de GOx fueron ligados a una tasa inicial de aproximadamente 3:1 (inserto: vector, respectivamente) utilizando 75 ng del vector y 68 ng del fragmento (figura 9). Es importante mencionar que se evaluaron múltiples proporciones de inserto a vector distintas variando entre 1:1 hasta 7:1 respectivamente, por lo cual fue necesario realizar extracciones de plásmido así como digestiones adicionales.



**Figura 9. Ligación del fragmento GOx al vector pCWORI conteniendo el gen  $CYP_{BM3}21B3$ .** A) Vector linearizado. B) Vector linearizado y tratado con ligasa. C) Vector linearizado, tratado con fosfatasa alcalina y ligasa. D) Células competentes. E) Transformación con plásmido purificado sin tratamientos. F) Ligación de vector linearizado tratado con fosfatasa alcalina y fragmento GOx.

Se realizaron una serie de controles para verificar la correcta digestión de vector así como la eficiencia del tratamiento con fosfatasa alcalina y de transformación. En la figura 9A se utilizó vector previamente linearizado y purificado a partir del gel para realizar la transformación bacteriana. En total se obtuvieron 6 colonias en las placas con antibiótico. En la placa B se evaluó la actividad ligasa mezclando con vector linearizado y como puede observarse, la enzima es catalíticamente activa. Se procedió a utilizar fosfatasa alcalina para prevenir la religación del vector al utilizar la ligasa y no se detectaron colonias (figura 9C). Las placas D y E fueron controles negativos y positivos respectivamente; en la caja D se sembraron células competentes y en la E se realizó una transformación con el vector purificado sin haber pasado por ningún

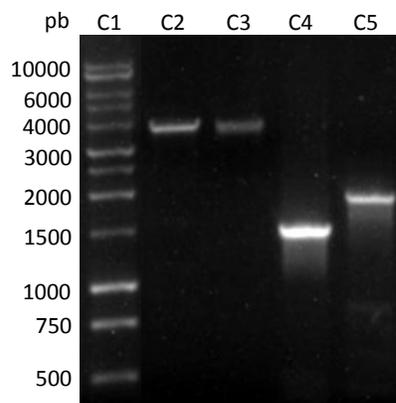
tratamiento. Finalmente, en la caja F se realizó la transformación con el producto de la ligación pCWORI tratado con fosfatasa alcalina y el fragmento GOx. Únicamente se pudieron detectar 4 colonias las cuales fueron analizadas mediante PCR de colonia utilizando los oligonucleótidos FWR\_237 y RV\_1394. Estos oligonucleótidos fueron diseñados para amplificar una región del vector pCWORI previo a la inserción del gen CYP<sub>BM3</sub>21B3 y hasta el nucleótido 1394 dentro de la secuencia de esta enzima. En caso de tener el inserto correspondiente a la GOx el amplificado tendría una longitud de 2934 pb, de lo contrario, el fragmento únicamente correspondería a una sección del citocromo con longitud de 1157 pb. En las 4 colonias mostradas en la imagen anterior así como los distintos intentos de clonación adicionales no mostrados, todos los fragmentos amplificaron en 1157 pb.

### 5.3.2 Clonación de los genes GOx y CYP<sub>BM3</sub>21B3 en el vector pBAD/myc-His B

Debido a la inhabilidad de poder clonar el gen que codifica para la GOx, se tomó la decisión de sintetizar el gen en IDT (Coralville, IA, USA). Se recibieron 100 ng a partir de los cuales se amplificó el fragmento utilizando oligonucleótidos que incorporaran los sitios de restricción XhoI y BamHI en las regiones 5' y 3' respectivamente. La idea detrás de estos sitios de restricción fue cambiar el vector pCWORI al pBAD/myc-His B e incorporar el gen que codifica para la glucosa oxidasa sobre el 5' con respecto al citocromo. Al utilizar el sitio de restricción BamHI sobre el 3' no habría cambios sobre el péptido de unión entre ambos dominios catalíticos de las enzimas y así, finalmente, se amplificaría el gen que codifica para el dominio hemo del CYP<sub>BM3</sub>21B3 utilizando oligonucleótidos que incorporarán los sitios de restricción BamHI y XbaI en las regiones 5' y 3' respectivamente (figura 10).

La amplificación por PCR de los fragmentos GOx y CYP<sub>BM3</sub>21B3 dio como resultado dos fragmentos del tamaño esperado como puede observarse en la figura 10. El vector pBADmyc-His B fue linearizado utilizando la enzima XhoI. Adicionalmente fue digerido con las enzimas XhoI y XbaI y purificado a través de columna en un kit "GeneElute PCR purification kit" (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) (carriles 2 y 3 respectivamente). Los productos de amplificación de los genes CYP<sub>BM3</sub>21B3 y GOx dieron lugar a dos bandas bien definidas con pesos moleculares alrededor de los 1439 pb para el gen de la CYP (carril 4) y 1772 pb para el gen de la GOx (carril 5). Con base a estos resultados se procedió a recuperar el resto del vector digerido con XhoI y XbaI a través de un gel en agarosa (carriles no mostrados).

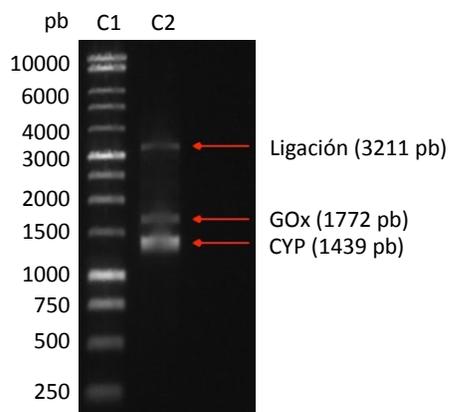
Se intentó realizar una ligación de ambos fragmentos y el vector en un solo paso utilizando tres relaciones inserto a vector distintas; 1:3, 1:5 y 1:7. Al realizar la transformación en *E. coli* se obtuvieron 7 colonias en



**Figura 10. Gel de agarosa del vector pBADmyc-His B y fragmentos GOx y CYP<sub>BM3</sub>21B3.** C1) Marcador de peso molecular. C2) Vector pBADmyc-His linearizado con XhoI. C3) Vector pBADmyc-His digerido con XhoI y XbaI y purificado por columna. C4) Fragmento de CYP<sub>BM3</sub>21B3 amplificado y digerido con BamHI y XbaI. C5) Fragmento de GOx amplificado y digerido con XhoI y BamHI.

la proporción 1:5 y 4 colonias en la relación 1:7. Se realizó un PCR de colonia utilizando los oligonucleótidos GOxFW\_Xho2 y GOxRV\_BamHI anteriormente descritos y una de las clonas resultó positiva. El plásmido resultante fue enviado a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN (Instituto de Biotecnología, UNAM) para comprobar la incorporación correcta de la construcción GOx-CYP<sub>BM3</sub>21B3, desafortunadamente la construcción presentó una deleción en la secuencia del oligonucleótido 5' del fragmento GOx lo que generó un cambio en el marco de lectura y la construcción no pudo ser expresada.

Se cambió la estrategia de ligación e intentó ligar los fragmentos por separado. El producto de ligación fue separado en un gel de agarosa y recuperado recortando la banda de 3211 pb que se muestra en la figura 11. El fragmento recuperado fue mezclado con ligasa y con el vector previamente digerido y purificado en proporciones 1:3 y 1:5 y de las clonas resultantes se realizaron PCRs de colonia como previamente mencionado. Este procedimiento se repitió en un par de ocasiones adicionales obteniendo un total de 3 clonas positivas en adición a la ya mencionada. Se encontró que en dos de las tres construcciones positivas se hubo deleciones en la misma región 5' que la clona inicial. En la clona restante hubo una deleción en la región 3' del fragmento GOx, muy próximo a la secuencia correspondiente al péptido de unión. En ninguno de los casos fue posible obtener una clona positiva que expresara la proteína de fusión.



**Figura 11.** Gel de agarosa de los fragmentos de amplificación del gen de la GOx y CYP<sub>BM3</sub>21B3. C1) Marcador de peso molecular. C2) Ligación de los fragmentos CYP<sub>BM3</sub>21B3 y GOx.

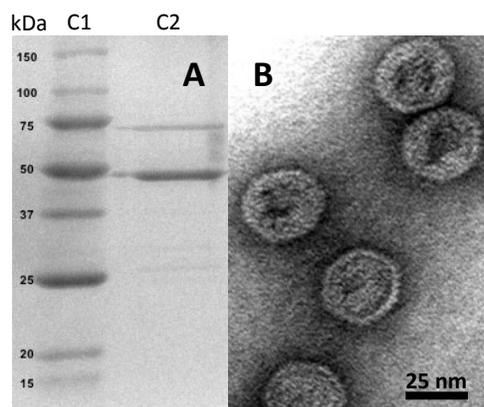
## 5.4 Nanorreactores a partir del bacteriófago P22

### 5.4.1 Obtención de VLPs P22-CYP<sub>BM3</sub>21B3

La cepa de *E. coli* conteniendo los vectores pBAD-CYPBM3-SP y pRSF-CP P22 que codifican para los genes del CYP<sub>BM3</sub>21B3 fusionado a una versión trunca de la proteína de andamiaje así como la proteína de capa del bacteriófago P22 respectivamente, fue inoculada en medio TB. La expresión del CYP-SP se realizó utilizando arabinosa como inductor génico en conjunto con ácido aminolevulínico requerido para la síntesis del grupo hemo. De forma secuencial se indujo la expresión de la proteína de cápside utilizando IPTG.

La purificación de las proteínas se realizó en dos pasos: ultracentrifugación y cromatografía de filtración en gel lo cual permitió separar las especies aberrantes (eluidas aproximadamente a los 45 min) de las cápsides ensambladas correctamente (con tiempo de elución cercano a los 65 min). Como mencionado por Zlotnick et al. (2012), es probable que la presencia de cápsides aberrantes de deba a un desbalance en la relación CYP-SP y CP del P22, en particular, al incrementar la concentración de la SP<sub>141</sub> (Parker et al., 1998). No obstante, fue posible purificar una población de cápsides con alto grado de pureza.

Las VLPs del P22-CYP fueron analizadas a través de una electroforesis en gel desnaturalizante de acrilamida al 12% en donde se pudieron observar dos bandas: una de 71.5 kDa correspondientes a la fusión del CYP<sub>BM3</sub>21B3-SP y otra de 46.6 kDa correspondiente a la CP del P22. Así mismo, las VLPs fueron analizadas mediante microscopía electrónica de transmisión utilizando una técnica de tinción negativa con acetato de uranilo. Esta técnica permitió visualizar el contorno de las partículas con un interior claro indicando la presencia de enzimas al interior. Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el programa ImageJ (NIH) y se observó una preparación monodispersa de partículas tipo virus con un diámetro promedio de 53.8 ( $\pm 5$ ) nm calculado como la media geométrica de dos mediciones ortogonales (figura 12).



**Figura 12. Purificación de VLPs del P22-CYP.** A) Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante de las VLPs purificadas. C1) Marcador de peso molecular. C2) Fusión CYP<sub>BM3</sub>21B3-SP (71.5 kDa) y CP del P22 (46.6 kDa). B) VLPs observadas al TEM; tinción negativa con acetato de uranilo.

La cantidad de CYP<sub>BM3</sub>21B3 contenido al interior de los nanorreactores fue evaluado por densitometría tomando como referencia las mediciones de absorbancia de la proteína total a 280 nm. La proporción de proteína de cápside por citocromo observada fue de 2.9 a 1 respectivamente. Con esta proporción y el coeficiente de extinción de la CP ( $\epsilon_{280} = 44,920 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) y la fusión CYP<sub>BM3</sub>21B3-SP ( $\epsilon_{280} = 52,830 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Patterson et al., 2012), la concentración de CYP<sub>BM3</sub>21B3 calculada fue de 92.28 ( $\pm 8.56$ ) enzimas por cápside. Estos valores son muy cercanos a las obtenidas anteriormente por Sánchez-Sánchez et al. (2015).

#### 5.4.2 Funcionalización de las VLPs P22-CYP<sub>BM3</sub>21B3 con GOx

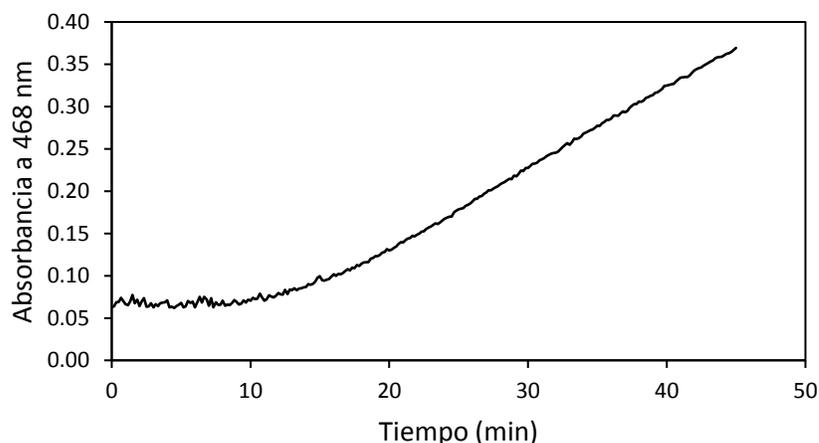
Se evaluó el efecto de la inmovilización de la glucosa oxidasa en las cadenas laterales de los aminoácidos constituyentes de la superficie de las VLPs sobre la actividad enzimática basada en glucosa y la morfología

de las cápsides. Para investigar el impacto de la conjugación enzimática, fue necesario remover cualquier material no adherido sobre la superficie de los nanorreactores. Idealmente esta separación se pudiera realizar mediante técnicas de separación de proteína por peso molecular, no obstante, debido al alto peso molecular de las cápsides, la separación se realizó por ultracentrifugación como explicado en la sección 5.1.4. Finalmente, las muestras fueron analizadas mediante TEM para visualmente evaluar la morfología de las cápsides.

La proporción de enzimas es un parámetro muy importante que determina la tasa de reacción final en una reacción en cascada. Si el citocromo está en exceso, la reacción se verá limitada por el suministro de  $H_2O_2$  generado por la GOx. En cambio, si la GOx está en exceso, se espera obtener una acumulación de peróxido de hidrógeno que podría inactivar al citocromo (Valderrama et al., 2002). Se inició con una proporción molar de 12 citocromos por cada glucosa oxidasa utilizada para la funcionalización tomando en consideración resultados previos obtenidos por Lorena Hernández (datos no publicados). Estos valores son muy cercanos a los valores teóricos calculados; la constante catalítica del  $CYP_{BM3}21B3$  es de  $720 \text{ min}^{-1}$  y  $10,400 \text{ min}^{-1}$  para la GOx, dando como resultado una tasa óptima de 14.4 citocromos por cada glucosa oxidasa para tener una tasa catalítica equivalente en ambas enzimas.

Los grupos carboxilo libres sobre la superficie de la GOx fueron activados utilizando NHS y EDC. La conjugación de proteínas con NHS y EDC se lleva a cabo en dos pasos: la primera reacción involucra la EDC para activar los grupos carboxilo sobre la superficie de la proteína. Esta reacción genera un intermediario de *O*-asylurea altamente reactivo e inestable en solución acuosa que si no forma un enlace con grupos amino rápidamente, se hidroliza y se regeneran los grupos carboxilos iniciales. La EDC une a la NHS con los grupos carboxilo de forma más estable, por lo que en el segundo paso se utiliza NHS para formar un éster conjugable con los grupos amino disponibles en la superficie de la proteína sobre la cual se desea inmovilizar. El pH de la reacción fue ajustado a 5.0 para reducir la reactividad de los grupos amino libres sobre la superficie de la GOx previo a mezclar ambas enzimas y así evitar la formación de agregados de GOx.

Como puede observarse en la figura 13, a esta proporción enzimática inicial fue notoria una fase latente que se prolongó entre 15 y 18 min lo que sugiere que la producción de peróxido de hidrógeno en un inicio no era la suficiente para promover la oxidación del DMP por el  $CYP_{BM3}21B3$ . Sin embargo, posteriormente la concentración de peróxido alcanza valores catalíticos necesarios para la actividad del CYP.

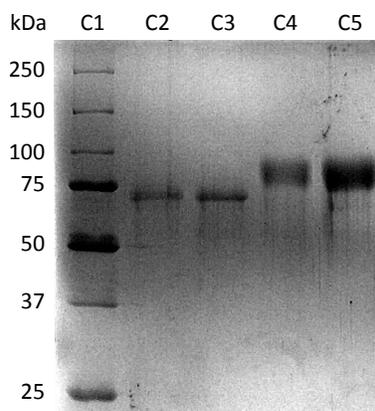


**Figura 13. Actividad enzimática de los nanorreactores P22-GOx-CYP<sub>BM3</sub>21B3.** Cascada enzimática de la preparación realizada utilizando una proporción enzimática inicial de 12 CYP<sub>BM3</sub>21B3 por GOx. La reacción inició agregando glucosa como sustrato.

### 5.4.3 Deglicosilación de la enzima GOx

La eficiencia de la reacción de conjugación entre la GOx y las VLPs es altamente dependiente de la presencia de grupos amino libres presentes en las cadenas laterales de los residuos de lisinas y argininas sobre la superficie de ambas proteínas (Wine et al., 2007). La GOx cuenta con 24 lisinas superficiales de las cuales únicamente 5 se encuentran disponibles para conjugación (Baszkin et al., 1997). La disponibilidad de grupos amino está enmascarada por la cubierta de carbohidratos que rodea a la enzima (Kalisz et al., 1991).

Con base a la baja actividad encontrada al evaluar la reacción en cascada de los nanorreactores funcionalizados con GOx, se procedió a investigar si era posible incrementar la conjugación enzimática al modificar o eliminar la cubierta glucosídica por medio de desglicosilación. La cubierta glucosídica de la GOx consiste de 190 residuos de manosa y 16 residuos de *N*-acetilglucosamina unidos mediante enlaces tipo *N*- o bien, *O*- a la enzima (Kalisz et al., 1991). La enzima  $\alpha$ -manosidasa es una glucosidasa inespecífica para el tipo de enlace glucosídico mientras que la endoglicosidasa H es altamente eficiente en el corte de manosas (Tarentino y Maley, 1974; Burrows y Rastall, 1998). Con base a estos datos, 15 mg de GOx fueron incubados durante 72 hrs a 37°C con 189 U de  $\alpha$ -manosidasa y 798 mU de endoglicosidasa H. El grado de deglicosilación fue analizado mediante una electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida (figura 14).



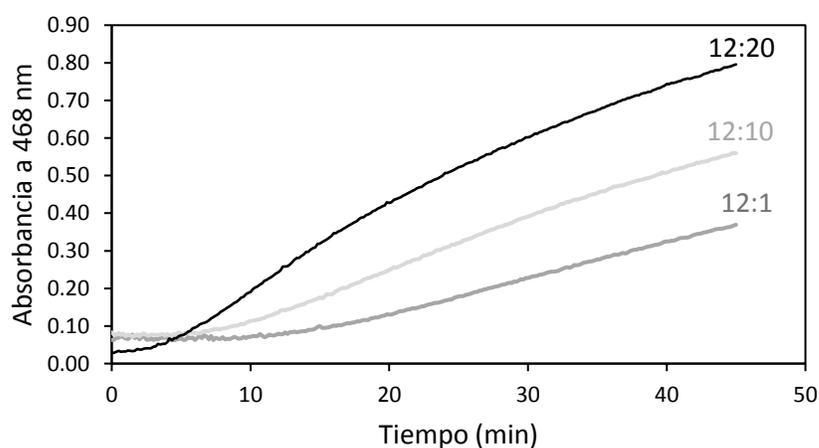
**Figura 14. Gel de poliacrilamida de la GOx deglicosilada.** C1) Marcador de peso molecular. C2 y C3) 0.5 y 1.5  $\mu\text{g}$  de GOx respectivamente. C4 y C5) 1.5 y 2.0  $\mu\text{g}$  de GOx deglicosilada respectivamente.

En la figura 14 se muestran dos concentraciones de enzima deglicosilada (0.5 y 1.5  $\mu\text{g}$ ) (carriles 2 y 3 respectivamente) como glicosilada (1.5 y 2.0  $\mu\text{g}$ ) (carriles 4 y 5 respectivamente). El peso molecular del monómero se redujo de 81 a 70.1 kDa al deglicosilar la enzima. Adicionalmente, las bandas corrieron de forma compacta a diferencia de la enzima sin tratamiento, donde se pueden observar bandas laxas características de proteínas glicosiladas (Kalisz et al., 1991). Estos valores son similares a los reportados por Courjean et al. (2009) quienes redujeron el peso molecular de  $78\pm 6$  a  $69\pm 4$  kDa, no obstante, es alrededor de 7 kDa mayor a los 63.3 kDa calculados a partir de la secuencia de amino ácidos de la enzima completamente deglicosilada. Esta diferencia es atribuida a la reducción en el acceso de las deglicosilasas a la interfase entre ambos monómeros de la GOx en donde se encuentra un residuo de acetilglucosamina y una cadena de carbohidratos que une las puntas de los sitios de interacción con FAD de ambos monómeros (Hecht et al., 1993).

La glucosa oxidasa deglicosilada fue utilizada para funcionalizar la superficie de los nanorreactores P22-CYP<sub>BM3</sub>21B3 y comparar las actividades de la reacción en cascada producidas entre las preparaciones con enzima glicosilada y deglicosilada. En todos los casos evaluados se encontraron actividades en el mismo orden de magnitud, indicando que la eficiencia en la conjugación de la enzima y los nanorreactores parece ser independiente de la cubierta de carbohidratos. Estos resultados podrían deberse al hecho de que tanto las proteínas de cápside como la GOx presentan grupos amino y carboxilo disponibles sobre la superficie en números mayores al número de enzimas GOx calculado sobre la superficie de las cápsides. Finalmente, el proceso de deglicosilación es caro y tardado por lo que se decidió continuar con el acoplamiento de

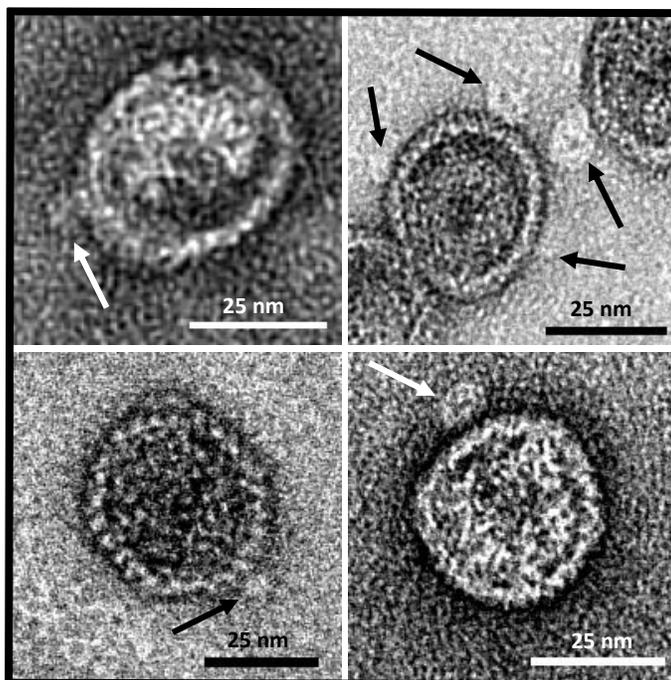
enzimas glicosiladas incrementando la proporción inicial de nanorreactores y GOx al llevar a cabo la funcionalización.

Se evaluaron dos proporciones adicionales a la de 12 citocromos por GOx: 12 a 10 y 12 a 20 respectivamente (figura 15). La mejor actividad obtenida se encontró en la proporción inicial 12 CYP<sub>BM3</sub>21B3 a 20 GOx en donde fue posible reducir la fase estacionaria inicial de entre 15 y 18 min para la preparación 12 a 1 CYP<sub>BM3</sub>21B3 a GOx respectivamente, a aproximadamente 4 min. Aun cuando se observó un incremento en la tasa catalítica de las reacciones en cascada al duplicar la concentración inicial de glucosa oxidasa, el incremento observado no justificó el gasto de enzima siendo desechado por la baja inmovilización y por ello no se continuó evaluando mayores proporciones enzimáticas.



**Figura 15. Comparación de la actividad enzimática de los nanorreactores P22-GOx-CYP<sub>BM3</sub>21B3.** Cascada enzimática de las preparaciones realizadas utilizando una proporción enzimática inicial de 12:1, 12:10 y 12:20 de CYP<sub>BM3</sub>21B3 por GOx respectivamente. Las reacciones iniciaron agregando glucosa como sustrato.

Para todas las preparaciones realizadas, el número de enzimas adheridas a la superficie de las cápsides fue determinado con base a la actividad de la glucosa oxidasa libre, asumiendo la misma actividad específica para enzimas libres e inmovilizadas. La eficiencia de la inmovilización de la GOx fue baja, considerando que el número estimado de enzimas por cápside fue 2.5, equivalente a 36.6 CYP<sub>BM3</sub>21B3 por molécula de glucosa oxidasa. Debido a las proporciones relativas entre las fusiones CYP<sub>BM3</sub>21B3-SP y la CP-GOx, no fue posible observar las bandas representativas en geles desnaturizantes de poliacrilamida. No obstante, la presencia de moléculas de glucosa oxidasa sobre la superficie de las VLPs del P22 fue observada claramente a través de TEM (figura 16).



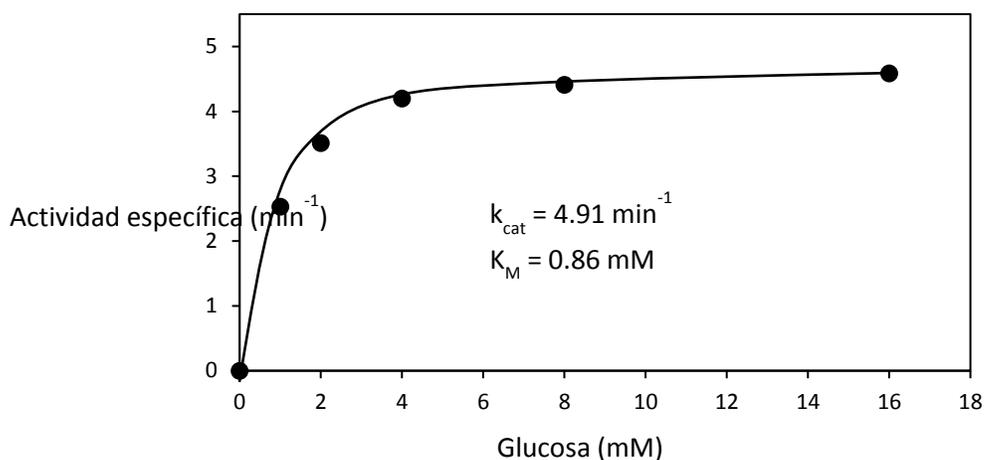
**Figura 16. Nanorreactores P22-CYP<sub>BM3</sub>21B3-GOx.** Nanorreactores observados al TEM; tinción negativa con acetato de uranilo. Las flechas muestran las moléculas de GOx adheridas a la superficie de las VLPs.

#### 5.4.4 Determinación de constantes catalíticas

La actividad enzimática de los nanorreactores P22-CYP<sub>BM3</sub>21B3-GOx se determinó espectrofotométricamente midiendo la oxidación de DMP al activar la reacción en cascada con glucosa. La máxima tasa catalítica fue medida a distintas concentraciones de glucosa para establecer la cinética Michaelis-Menten (figura 17) y se encontró que la constante catalítica fue de  $4.91 \text{ min}^{-1}$  y la constante de afinidad representó  $0.86 \text{ mM}$  de glucosa. La constante catalítica obtenida en la transformación de DMP al utilizar citocromo libre fue de  $720 \text{ min}^{-1}$  con una  $K_M = 18.5 \text{ mM}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La actividad específica para los nanorreactores fue significativamente menor a la encontrada para la enzima libre al utilizar el mismo sustrato, sin embargo, la  $K_M$  para la glucosa en los nanorreactores fue significativamente menor en comparación con la determinada para la enzima libre ( $K_M = 17.2 \text{ mM}$ ).

Para alcanzar la máxima tasa de transformación con el citocromo se requiere de una alta concentración de peróxido de hidrógeno como se muestra por la  $K_M$  de la enzima libre, sin embargo, es necesario mencionar que al incrementar las concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  la estabilidad del CYP se puede ver altamente

afectada. Es interesante notar que en el caso contrario, los nanorreactores muestran una mejor constante de afinidad por glucosa que lo encontrado para la GOx libre.



**Figura 17. Cinética Michaelis-Menten de los nanorreactores P22-CYP<sub>BM3</sub>21B3-GOx.** Cascada enzimática utilizando 160  $\mu\text{g}$  de nanorreactores en medio de reacción con 500  $\mu\text{M}$  DMP y distintas concentraciones de glucosa en Tris-HCl 50  $\text{mM}$ , pH 8.0 a 25°C.

La transformación enzimática global está mediada por una combinación entre la tasa de transformación y la estabilidad enzimática. En las reacciones en cascada de los nanorreactores, cuando la GOx está expuesta a una baja concentración de glucosa la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  es lenta y debe acumularse –en el transcurso de algunos minutos- para alcanzar concentraciones suficientemente elevadas para activar la reacción del CYP. Por otra parte, cuando la concentración de glucosa es elevada, la producción de peróxido parece exceder la tasa de consumo por el citocromo lo cual a su vez genera una acumulación que tiene a inducir la inactivación del CYP y por tanto, afectar la tasa de recambio del sistema.

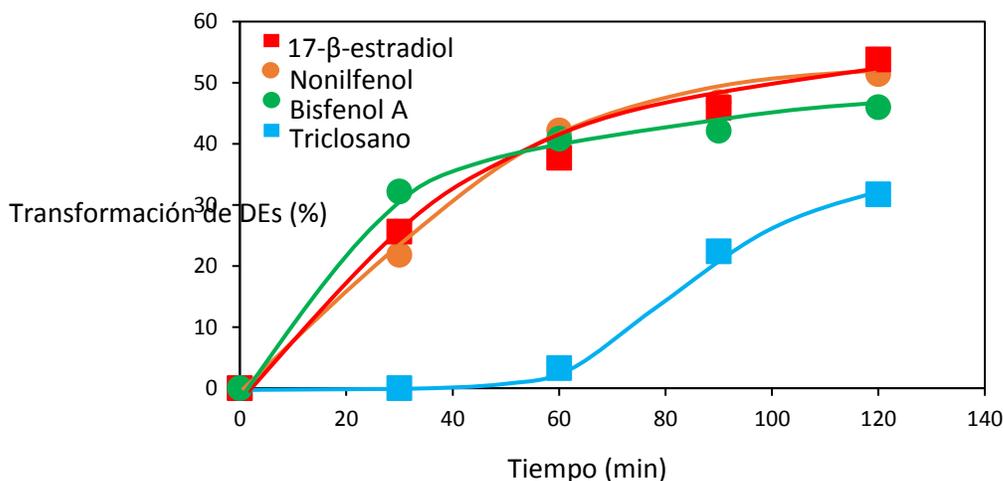
#### 5.4.5 Transformación de disruptores endocrinos

La capacidad de los nanorreactores producidos para transformar distintos disruptores endócrinos en presencia de glucosa fue evaluada. Los nanorreactores enzimáticos efectivamente transformaron varios DEs en presencia de glucosa y sin la necesidad de requerir cofactores energéticamente costosos como el NAD(P)H. La transformación de disruptores endocrinos medida por glucosa ha sido previamente reportada utilizando CLEAs (por sus siglas en inglés “crosslinked enzyme aggregates”) de peroxidasas versátiles y glucosa oxidasa (Taboada-Puig et al., 2011), sin embargo, estos agregados macroscópicos son insolubles, además de estar limitados en la transferencia de masa. Por otra parte, los nanorreactores basados en VLPs

son catalizadores nanoestructurados que tienen la capacidad de permanecer en suspensión y por tanto, se pueden esperar limitaciones en la transferencia de masa mucho menores.

Los resultados obtenidos en las distintas transformaciones fueron comparados con los obtenidos al realizar las transformaciones con CYP<sub>BM3</sub>21B3 en presencia de peróxido de hidrógeno 3 mM. Las transformaciones fueron monitoreadas a través de un HPLC y con la excepción del resorcinol, los 4 disruptores endocrinos restantes fueron transformados enzimáticamente.

En el análisis de cromatogramas del HPLC se observó una clara reducción del área bajo la curva generada por los sustratos, así mismo, fue evidente la generación de productos de la reacción. Como puede observarse en la figura 18, después de 120 min de reacción el grado de transformación entre el 17- $\beta$ -estradiol, nonilfenol y el bisfenol A varió entre un 45 y 55% en claro contraste con la fase latente que se prolongó cerca de 60 min y la reducida tasa de transformación (cercana al 30%) observada con el triclosano. Tomando en consideración que la transformación de los DEs se realizó en presencia de glucosa 95 mM, es altamente probable que la aparente fase estacionaria observada después de los 100 min de reacción se deba a una inactivación del citocromo como mencionado anteriormente.



**Figura 18. Transformación de DEs por los nanorreactores P22-CYP<sub>BM3</sub>21B3-GOx activados con glucosa.** Cascada enzimática utilizando 355.6  $\mu$ g de nanorreactores en medio de reacción con 100  $\mu$ M DE, 95 mM glucosa en Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 a 25°C.

Las actividades específicas del CYP<sub>BM3</sub>21B3 libre y los nanorreactores fueron comparadas con base a la concentración de CYP utilizado en las reacciones y se encontró que el rango de actividad de los nanorreactores fue extenso, variando entre 22 y 77% con respecto al citocromo libre (tabla 20). Las VLPs con actividad citocromo están decoradas con pocas moléculas de GOx (figura 16), adicionalmente, el interior de la VLP está altamente confinado (con alrededor de 92 CYPs por cápside) y es muy probable que

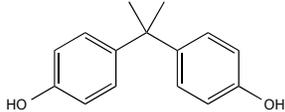
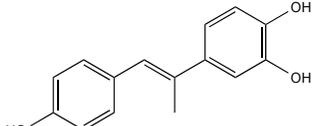
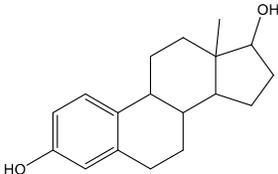
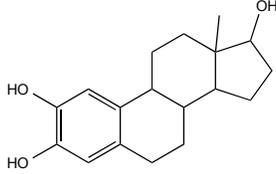
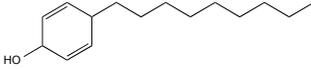
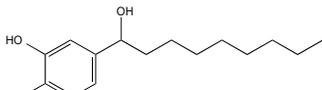
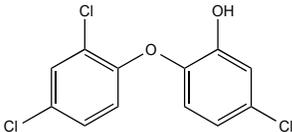
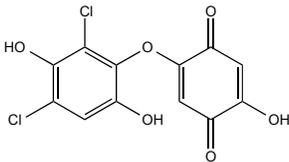
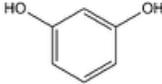
no todas las enzimas tengan acceso al sustrato. Esta pérdida de actividad al encapsidar al CYP ha sido previamente reportado en rangos del 14 y el 48% cuando se ha inmovilizado a estas enzimas en otro tipo de materiales (Maurer et al., 2003; Zhao et al., 2011; Weber et al., 2010), no obstante, las actividades específicas calculadas para los nanorreactores -con relación a la concentración de citocromo- estuvieron en el mismo orden de magnitud que las obtenidas con el CYP libre.

#### 5.4.6 Identificación de los productos de transformación

El análisis de los productos de transformación de los DEs a través de cromatografía líquida acoplada a un detector de espectrometría de masas (nLC/MS) permitió identificar los principales productos generados a partir del BPA, E2, NPh y TCS (tabla 20). Lai et al. (2018) reportaron un producto de transformación con un pico de 242  $m/z$  generado por la deshidrogenación e hidroxilación simultánea de BPA causada por la oxidación de radicales libres. Estos resultados coinciden con el principal producto de transformación del BPA detectado en este trabajo ([M-3H] -239). Poerschmann et al. (2010) reportaron que algunos bifenoles pueden formarse gracias al acoplamiento de reacciones oxidativas de radicales libres lo que podría explicar la unión entre las moléculas de BPA y por tanto, la presencia de dímeros ( $m/z$ : 454) y trímeros ( $m/z$ : 680) en cantidades traza detectados en los cromatogramas. Por otra parte, la transformación de E2 por acción de los citocromos ha sido reportada en distintos trabajos (Badawi et al., 2001; Kang et al., 2014; Lee et al., 2003) y el principal producto hidroxilado es consistente con nuestros resultados.

Es importante mencionar que los citocromos humanos tienen la capacidad de transformar compuestos androgénicos (Cheng et al., 2012) y la hidroxilación del nonilfenol sobre el anillo aromático así como en el carbono alifático ha sido reportado al utilizar microsomas de hígado humano (Tezuka et al., 2007). Finalmente, el metabolismo *in vivo* del triclosano por lo general involucra la hidroxilación aromática y en menor medida, la eliminación del enlace éter. La principal hidroxilación se lleva a cabo en los sitios orto y meta al enlace éter (Tulp et al., 1979; Wu et al., 2017), sin embargo, la quinona dehalogenada y altamente hidroxilada detectada en nuestro trabajo no ha sido previamente reportada.

**Tabla 20. Actividades específicas y principales productos de transformación de los EDCs.**

Estructura del DE	Actividad específica basada en CYP (min <sup>-1</sup> )			Principales productos de la transformación
	CYP libre	P22-CYP-GOx	P22-CYP-GOx/ CYP libre (%)	
 Bisfenol A	0.350	0.169	48.3	 MW: 244.28
 Estradiol	0.175	0.134	76.6	 MW: 288.38
 Nonilfenol	0.320	0.114	35.6	 MW: 252.34
 Triclosan	0.456	0.100	21.9	 MW: 335.52
 Resorcinol	NR <sup>a</sup>	NR	---	---

NR<sup>a</sup>: no se detectó reacción.

## Capítulo 6. Conclusiones

---

### 6.1 Conclusiones

El objetivo principal del proyecto fue el diseñar y producir nanorreactores conteniendo actividad citocromo P450 siendo activada por la presencia de glucosa. Para tal efecto a lo largo de este proyecto se trabajó con cuatro estrategias y en dos de las estrategias se presentan resultados positivos con lugar a mejorar los nanorreactores producidos; la funcionalización de partículas inorgánicas y la funcionalización de la superficie de VLPs del bacteriófago P22 conteniendo actividad CYP<sub>BM3</sub>21B3 en su interior.

La estrategia para co-encapsidar las enzimas CYP<sub>BM3</sub>21B3 y GOx al interior de las cápsides del CCMV no permitió observar una reacción en cascada. No obstante, en distintas preparaciones realizadas se detectó buena actividad enzimática por separado, es decir, en algunas preparaciones se presentó actividad glucosa oxidasa y en otras distintas CYP<sub>BM3</sub>21B3. Estos resultados indican que las cargas complementarias entre las enzimas y la superficie interna de la cápside del CCMV permiten dirigir a las enzimas hacia el interior de la cápside, sin embargo, debido a la carga negativa de ambas enzimas bajo las condiciones de ensamblado utilizadas, la repulsión electrostática entre ellas supera su atracción individual al interior de la cápside y por tanto, no se genera una reacción en cascada detectable.

La producción de la enzima de fusión fue una de las principales estrategias evaluadas a lo largo de tres años de este proyecto, sin embargo, fue posible expresar la proteína de fusión. El motivo por el cual el 3 de las 4 clonas obtenidas presentaron una delección en la misma región 5' previa al codón de inicio así como la clona adicional que presentó una mutación que insertó un codón de paro previo a terminar la secuencia de la GOx aún se desconoce. Esta línea de investigación se ha retomado para futuros trabajos y se evalúa la posibilidad de sintetizar la fusión completa.

La funcionalización de las nanopartículas inorgánicas generó nanorreactores con buena actividad enzimática. La estrategia de silanización ha sido empleada en otros trabajos del grupo en donde el tamaño de las partículas no es un punto crítico y ha dado buenos resultados en la conjugación de enzimas individuales. La capacidad de adherir dos enzimas y detectar el producto de la reacción en cascada es un resultado que podría ser retomado a futuro ya que la actividad del CYP<sub>BM3</sub>21B3 en conjunto con las propiedades fisicoquímicas de estas nanopartículas han sido utilizadas en diversas terapias contra el

cáncer por separado. Es importante resaltar que se deberán encontrar estrategias para controlar e uniformizar los tamaños de estas nanopartículas antes de cualquier ensayo terapéutico.

La encapsidación del CYP<sub>BM3</sub>21B3 dentro de las cápsides del bacteriófago P22 generó nanorreactores con alta capacidad de carga (aproximadamente 92 citocromos por cápside) y buena actividad catalítica. Estas VLPs fueron conjugadas con GOx sobre la superficie externa y como prueba de concepto se evaluó su capacidad de transformar 5 disruptores endocrinos con diversas estructuras utilizando únicamente glucosa para generar el peróxido de hidrógeno necesario para activar a los citocromos al interior de las cápsides. La capacidad de transformar los disruptores endocrinos en conjunto con el hecho de que estos nanorreactores están constituidos exclusivamente por proteína y pueden actuar como un sistema de transporte y suministro localizado de actividad enzimática, claramente muestran el potencial uso de estos nanorreactores virales en la eliminación de DE u otros compuestos tóxicos en diversos tejidos e incluso a nivel celular.

Finalmente, la reacción en cascada producida por los nanorreactores enzimáticos se presenta como una plataforma con mucho potencial en el uso terapéutico, específicamente en la activación de profármacos mediada por la transformación de glucosa para el tratamiento de cáncer, así como otras potenciales aplicaciones biomédicas.

## Literatura citada

---

### Literatura citada

- Alejo-González, K., Quester, K., Hanson, E., Secundino, I., Rosenstein, Y., Huerta-Saquero, A., Vazquez-Duhalt, R. 2017. PEGylation of cytochrome P450 enhances its biocatalytic performance for pesticide transformation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 163–170. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.07.014
- Ali, A., Roossinck, M. J. 2007. Rapid and efficient purification of Cowpea chlorotic mottle virus by sucrose cushion ultracentrifugation. *Journal of Virological Methods*, 141(1), 84–86. doi:10.1016/j.jviromet.2006.11.038
- Badawi, A. F., Cavalieri, E. L., Rogan, E. G. 2001. Role of human cytochrome P450 1A1, 1A2, 1B1, and 3A4 in the 2-, 4-, and 16 $\alpha$ -hydroxylation of 17 $\beta$ -estradiol. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 50(9), 1001–1003. doi:10.1053/meta.2001.25592
- Bancroft, J. B., Hiebert, E. 1967. Formation of an infectious nucleoprotein from protein and nucleic acid isolated from a small spherical virus. *Virology*, 32(2), 354–356.
- Baszkin, A., Boissonnade, M. M., Rosilio, V., Kamyshny, A., Magdassi, S. 1997. Adsorption of hydrophobized glucose oxidase at solution/air interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 190(2), 313–317. doi:10.1006/jcis.1997.4874
- Bernhardt, R. 2006. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *Journal of Biotechnology*, 124(1), 128–145. doi:10.1016/j.jbiotec.2006.01.026
- Beszterda, M., Frański, R. 2018. Endocrine disruptor compounds in environment: As a danger for children health. *Pediatric Endocrinology, Diabetes and Metabolism*, 24(2), 88–95. doi:10.18544/PEDM-24.02.0107
- Black, S. D., Martin, S. T. 1994. Evidence for Conformational Dynamics and Molecular Aggregation in Cytochrome P450 102 (BM-3). *Biochemistry*, 33(40), 12056–12062. doi:10.1021/bi00206a007
- Brasch, M., Putri, R. M., De Rooter, M. V., Luque, D., Koay, M. S. T., Castón, J. R., Cornelissen, J. J. L. M. 2017. Assembling enzymatic cascade pathways inside virus-based nanocages using dual-tasking nucleic acid tags. *Journal of the American Chemical Society*, 139(4), 1512–1519. doi:10.1021/jacs.6b10948
- Burrows, H. M., Rastall, R. A. 1998. Essential carboxyl and tryptophan residues in Jack Bean  $\alpha$ -D-mannosidase. *Phytochemistry*, 48(2), 257–260. doi:10.1016/S0031-9422(97)01095-9

- Cajthaml, T., Křesinová, Z., Svobodová, K., Möder, M. 2009. Biodegradation of endocrine-disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi. *Chemosphere*, 75(6), 745–750. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.01.034
- Capdevila, J. H., Falck, J. R., Estabrook, R. W. 1992. Cytochrome P450 and the arachidonate cascade. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 6(2), 731–736.
- Carette, L. L. E., Engelkamp, H., Akpa, E., Pierre, S. J., Cameron, N. R., Christianen, P. C. M., Maan, J. A. N. C., Thies, J. C., Weberskirch, R., Rowan, A. E., Nolte, R. J. M., Michon, T., Van Hest, J. C. M. 2007. A virus-based biocatalyst. *Nature Nanotechnology*, 2(April), 226–229. doi:10.1038/nnano.2007.76
- Casals-Casas, C., Desvergne, B. 2011. Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annual review of physiology*, 73, 135–162. doi:10.1146/annurev-physiol-012110-142200
- Chauhan, K., Hernandez-Meza, J. M., Rodríguez-Hernández, A. G., Juárez-Moreno, K., Sengar, P., Vazquez-Duhalt, R. 2018. Multifunctionalized biocatalytic P22 nanoreactor for combinatory treatment of ER+ breast cancer. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(17). doi:10.1186/s12951-018-0345-2
- Cheng, Q., Sohl, C. D., Yoshimoto, F. K., Guengerich, F. P. 2012. Oxidation of dihydrotestosterone by human cytochromes P450 19A1 and 3A4. *Journal of Biological Chemistry*, 287(35), 29554–29567. doi:10.1074/jbc.M112.390047
- Choi, O., Kim, B. C., An, J. H., Min, K., Kim, Y. H., Um, Y., Oh, M. K., Sang, B. I. 2011. A biosensor based on the self-entrapment of glucose oxidase within biomimetic silica nanoparticles induced by a fusion enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, 49(5), 441–445. doi:10.1016/j.enzmictec.2011.07.005
- Cirino, P. C. 2004. Laboratory evolution of cytochrome P450 peroxygenase activity. *California Institute of Technology*. 220 pp.
- Cirino, P. C., Arnold, F. H. 2003a. A Self-Sufficient Peroxide-Driven Hydroxylation Biocatalyst. *Angewandte Chemie International Edition*, 42(28), 3299–3301.
- Cirino, P. C., Arnold, F. H. 2003b. A Self-Sufficient Peroxide-Driven Hydroxylation Biocatalyst Supporting Information. *Angewandte Chemie International Edition*, 42(28).
- Comellas-Aragonès, M., Engelkamp, H., Claessen, V. I., Sommerdijk, N. A. J. M., Rowan, A. E., Christianen, P. C. M., Maan, J. C., Verduin, B. J. M., Cornelissen, J. J. L. M., Nolte, R. J. M. 2007. A virus-based single-enzyme nanoreactor. *Nature Nanotechnology*, 2(10), 635–639. doi:10.1038/nnano.2007.299
- Cortines, J. R., Weigele, P. R., Gilcrease, E. B., Casjens, S. R., Teschke, C. M. 2011. Decoding bacteriophage P22 assembly: Identification of two charged residues in scaffolding protein responsible for coat protein interaction. *Virology*, 421(1), 1–11. doi:10.1016/j.virol.2011.09.005

- Courjean, O., Gao, F., Mano, N. 2009. Deglycosylation of Glucose Oxidase for Direct and Efficient Glucose Electrooxidation on a Glassy Carbon Electrode. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(32), 5897–5899.
- Denisov, I., Makris, T., Sligar, S., Schlichting, I. 2005. Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chemical reviews*, 105(6), 2253–2278.
- Eppler, K., Wyckoff, E., Goates, J., Parr, R., Casjens, S. 1991. Nucleotide sequence of the bacteriophage P22 genes required for DNA packaging. *Virology*, 183(2), 519–538. doi:10.1016/0042-6822(91)90981-G
- Faure, B., Salazar-Alvarez, G., Ahniyaz, A., Villaluenga, I., Berriozabal, G., De Miguel, Y. R., Bergström, L. 2013. Dispersion and surface functionalization of oxide nanoparticles for transparent photocatalytic and UV-protecting coatings and sunscreens. *Science and Technology of Advanced Materials*, 14(2), 23001–23024. doi:10.1088/1468-6996/14/2/023001
- Fox, J. M., Wang, G., Speir, J. A., Olson, N. H., Johnson, J. E., Baker, T. S., Young, M. J. 1998. Comparison of the native CCMV virion with in vitro assembled CCMV virions by cryoelectron microscopy and image reconstruction. *Virology*, 244(1), 212–218. doi:10.1006/viro.1998.9107
- Frederick, K. R., Tung, J., Emerick, R. S., Masiarz, F. R., Chamberlain, S. H., Vasavada, A., Rosenberg, S. 1990. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Cloning, gene sequence, secretion from *Saccharomyces cerevisiae* and kinetic analysis of a yeast-derived enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 265(7), 3793–3802. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0076-6879(66)09022-0
- Garcea, R. L., Gissmann, L. 2004. Virus-like particles as vaccines and vessels for the delivery of small molecules. *Current Opinion in Biotechnology*, 15(6), 513–517. doi:10.1016/j.copbio.2004.10.002
- Gillam, E. M. J. 2008. Engineering cytochrome p450 enzymes. *Chemical research in toxicology*, 21(1), 220–231.
- Grabowski, G. A., Hopkin, R. J. 2003. Enzyme therapy for lysosomal storage disease : principles, practice, and prospects. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 4(1), 403–436. doi:10.1146/annurev.genom.4.070802.110415
- Guengerich, F. P. 2001. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 14(6), 611–650. doi:10.1021/tx0002583
- Hecht, H. J., Kalisz, H. M., Hendle, J., Schmid, R. D., Schomburg, D. 1993. Crystal Structure of Glucose Oxidase from *Aspergillus niger* Refined at 2.3 Å Reslution. *Journal of Molecular Biology*, 229(1), 153–172. doi:10.1006/jmbi.1993.1015
- Heindel, J. J., Blumberg, B., Cave, M., Machtinger, R., Mantovani, A., Mendez, M. A., Nadal, A., Palanza, P., Panzica, G., Sargis, R., Vandenberg, L. N., vom Saal, F. 2017. Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders. *Reproductive Toxicology*, 68, 3–33. doi:10.1016/j.reprotox.2016.10.001

- Holcenberg, J. S. 1982. Enzyme Therapy : Problems and solutions. Annual Reviews of Biochemistry, (51), 795–812. doi:10.1146/annurev.bi.51.070182.004051
- Hou, J., Dong, G., Ye, Y., Chen, V. 2014. Laccase immobilization on titania nanoparticles and titania-functionalized membranes. Journal of Membrane Science, 452, 229–240.
- Joo, H., Arisawa, A., Lin, Z., Arnold, F. H. 1999. A high-throughput digital imaging screen for the discovery and directed evolution of oxygenases. Chemistry and Biology, 6(10), 699–706. doi:10.1016/S1074-5521(00)80017-4
- Jordan, J., Jacob, K. I., Tannenbaum, R., Sharaf, M. A., Jasiuk, I. 2005, febrero 25. Experimental trends in polymer nanocomposites - A review. Materials Science and Engineering A, Vol. 393. doi:10.1016/j.msea.2004.09.044
- Kalish, H. M., Hecht, H.-J., Schomburg, D., Schmid, R. D. 1990. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a deglycosylated glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Journal of molecular biology, 213(2), 207–209.
- Kalish, H. M., Hecht, H.-J., Schomburg, D., Schmid, R. D. 1991. Effects of carbohydrate depletion on the structure, stability and activity of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular, 1080(2), 138–142. doi:10.1016/0167-4838(91)90140-U
- Kang, J. Y., Ryu, S. H., Park, S. H., Cha, G. S., Kim, D. H., Kim, K. H., Hong, A. W., Ahn, T., Pan, J. G., Jung, Y. H., Kang, H. S., Yun, C. H. 2014. Chimeric cytochromes P450 engineered by domain swapping and random mutagenesis for producing human metabolites of drugs. Biotechnology and Bioengineering, 111(7), 1313–1322. doi:10.1002/bit.25202
- Keller, A. A., Wang, H., Zhou, D., Lenihan, H. S., Cherr, G., Cardinale, B. J., Miller, R., Zhaoxia, J. I. 2010. Stability and aggregation of metal oxide nanoparticles in natural aqueous matrices. Environmental Science and Technology, 44(6), 1962–1967. doi:10.1021/es902987d
- Koyani, R., Pérez-Robles, J., Cadena-Nava, R. D., Vazquez-Duhalt, R. 2017. Biomaterial-based nanoreactors, an alternative for enzyme delivery. Nanotechnology Reviews, 6(5), 405–419. doi:10.1515/ntrev-2016-0071
- Kumar, S. 2010. Engineering Cytochrome P450 Biocatalysts for Biotechnology, Medicine, and Bioremediation. Expert Opinions in Drug Metabolism and Toxicology, 6(2), 115–131. doi:10.1517/17425250903431040.Engineering
- Kumar, S., Halpert, J. R. 2005. Use of directed evolution of mammalian cytochromes P450 for investigating the molecular basis of enzyme function and generating novel biocatalysts. Biochemical and biophysical research communications, 338(1), 456–464.
- Kushnir, N., Streatfield, S. J., Yusibov, V. 2012, diciembre 17. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: Diversity of targets and production systems and advances in clinical development. Vaccine, Vol. 31. doi:10.1016/j.vaccine.2012.10.083

- Lai, L., Zhou, H., Lai, B. 2018. Heterogeneous degradation of bisphenol A by peroxymonosulfate activated with vanadium-titanium magnetite: Performance, transformation pathways and mechanism. *Chemical Engineering Journal*, 349, 633–645. doi:10.1016/j.cej.2018.05.134
- Lee, A. J., Cai, M. X., Thomas, P. E., Conney, A. H., Zhu, B. T. 2003. Characterization of the oxidative metabolites of 17 $\beta$ -estradiol and estrone formed by 15 selectively expressed human cytochrome P450 isoforms. *Endocrinology*, 144(8), 3382–3398. doi:10.1210/en.2003-0192
- Leskovac, V., Trivić, S., Wohlfahrt, G., Kandrač, J., Peričin, D. 2005. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: The mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, Vol. 37. doi:10.1016/j.biocel.2004.10.014
- Li, H., Zhang, Z., Ma, X., Hu, M., Wang, X., Fan, P. 2007. Synthesis and characterization of epoxy resin modified with nano-SiO<sub>2</sub> and  $\gamma$ -glycidoxypropyltrimethoxy silane. *Surface and Coatings Technology*, 201(9-11 SPEC. ISS.), 5269–5272. doi:10.1016/j.surfcoat.2006.07.143
- Lin, H., Chen, Y., Shi, J. 2018. Nanoparticle-triggered: In situ catalytic chemical reactions for tumour-specific therapy. *Chemical Society Reviews*, 47(6), 1938–1958. doi:10.1039/c7cs00471k
- Lua, L., Connors, N., Sainsbury, F., Chuan, Y., Wibowo, N., Middelberg, A. 2014. Bioengineering virus-like particles as vaccines. *Biotechnology and bioengineering*, 111(3), 425–440.
- Matthiessen, P., Wheeler, J. R., Weltje, L. 2018. A review of the evidence for endocrine disrupting effects of current-use chemicals on wildlife populations. *Critical Reviews in Toxicology*, 48(3), 195–216. doi:10.1080/10408444.2017.1397099
- Maurer, S. C., Schulze, H., Schmid, R. D., Urlacher, V. 2003. Immobilisation of P450 BM-3 and an NADP+ Cofactor Recycling System: Towards a Technical Application of Heme-Containing Monooxygenases in Fine Chemical Synthesis. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 345(67), 802–810. doi:10.1002/adsc.200303021
- Minten, I. J., Claessen, V. I., Blank, K., Rowan, A. E., Nolte, R. J. M., Cornelissen, J. J. L. M. 2011. Catalytic capsids: The art of confinement. *Chemical Science*, 2(2), 358–362. doi:10.1039/c0sc00407c
- Minten, I. J., Hendriks, L. J. A., Nolte, R. J. M., Cornelissen, J. J. L. M. 2009. Controlled encapsulation of multiple proteins in virus capsids. *Journal of the American Chemical Society*, 131(49), 17771–17773. doi:10.1021/ja907843s
- Mirabedini, S. M., Mohseni, M., PazokiFard, S., Esfandeh, M. 2008. Effect of TiO<sub>2</sub> on the mechanical and adhesion properties of RTV silicone elastomer coatings. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 317(1–3), 80–86. doi:10.1016/j.colsurfa.2007.09.044
- Mitchell, D. T., Lee, S. B., Trofin, L., Li, N., Nevanen, T. K., Söderlund, H., Martin, C. R. 2002. Smart nanotubes for bioseparations and biocatalysis. *Journal of the American Chemical Society*, 124(40), 11864–11865. doi:10.1021/ja027247b

- Monneret, C. 2017. What is an endocrine disruptor? *Comptes Rendus - Biologies*, 340(9–10), 403–405. doi:10.1016/j.crvi.2017.07.004
- Munro, A. W., McLean, K. J., Grant, J. L., Makris, T. M. 2018. Structure and function of the cytochrome P450 peroxxygenase enzymes. *Biochemical Society Transactions*, 46(1), 183–196. doi:10.1042/BST20170218
- Nebert, D. W., Russell, D. W. 2002. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet*, 360(9340), 1155–1162.
- Nelson, D. R. 2013. A world of cytochrome P450s. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1612). doi:10.1098/rstb.2012.0430
- Nelson, D. R., Kamataki, T., Waxman, D. J., Guengerich, P., Estabrook, R. W., Feyereisen, R., Stegeman, J. J., Gonzalez, F. J., Coon, M. J., Gunsalus, I. C., Gotoh, O., Okuda, K., Nebert, D. W. 1993. The P450 Superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA and Cell Biology*, 12(1), 1–51. doi:10.1097/00008571-199602000-00002
- Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus, I. C., Nebert, D. W. 1996. P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, Vol. 6. doi:10.1097/00008571-199602000-00002
- O’Neil, A., Reichhardt, C., Johnson, B., Prevelige, P. E., Douglas, T. 2011. Genetically Programmed In Vivo Packaging of Protein Cargo and Its Controlled Release from Bacteriophage P22. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(32), 7425–7428. doi:10.1002/anie.201102036
- Omura, T., Sato, R. 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *The Journal of Biological Chemistry*, 239(7), 2370–2378.
- Parker, M. H., Casjens, S., Prevelige, P. E. 1998. Functional domains of bacteriophage P22 scaffolding protein. *Journal of Molecular Biology*, 281(1), 69–79. doi:10.1006/jmbi.1998.1917
- Patterson, D. P., McCoy, K., Fijen, C., Douglas, T. 2014. Constructing catalytic antimicrobial nanoparticles by encapsulation of hydrogen peroxide producing enzyme inside the P22 VLP. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(36), 5948. doi:10.1039/C4TB00983E
- 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 Chemical Biology*, 9(2), 359–365. doi:10.1021/cb4006529
- Poerschmann, J., Trommler, U., Górecki, T. 2010. Aromatic intermediate formation during oxidative degradation of Bisphenol A by homogeneous sub-stoichiometric Fenton reaction. *Chemosphere*, 79(10), 975–986. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.03.030
- Rando, D., Kohring, G. W., Giffhorn, F. 1997. Production, purification and characterization of glucose oxidase from a newly isolated strain of *Penicillium pinophilum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48(1), 34–40. doi:10.1007/s002530051011
- Ruettinger, R. T., Wen, L. P., Fulco, A. J. 1989. Coding nucleotide, 5' regulatory, and deduced amino acid sequences of P-450(BM-3), a single peptide cytochrome P-450:NADPH-P-450 reductase from *Bacillus megaterium*. *Journal of Biological Chemistry*, 264(19), 10987–10995.
- Sabzi, M., Mirabedini, S. M., Zohuriaan-Mehr, J., Atai, M. 2009. Surface modification of TiO<sub>2</sub> nano-particles with silane coupling agent and investigation of its effect on the properties of polyurethane composite coating. *Progress in Organic Coatings*, 65(2), 222–228.
- Salazar, O., Cirino, P. C., Arnold, F. H. 2003. Thermostabilization of a cytochrome P450 peroxygenase. *ChemBioChem*, 4(9), 891–893. doi:10.1002/cbic.200300660
- Sánchez-Sánchez, L., Cadena-Nava, R., Palomares, L., Ruiz-Garcia, J., Koay, M., Cornelissen, J., Vazquez-Duhalt, R. 2014. Chemotherapy pro-drug activation by biocatalytic virus-like nanoparticles containing cytochrome P450. *Enzyme and microbial technology*, 60, 24–31.
- Sánchez-Sánchez, 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. *Journal of Nanobiotechnology*, 13(1), 66. doi:10.1186/s12951-015-0127-z
- Schoonen, L., Maassen, S., Nolte, R. J. M., van Hest, J. C. M. 2017. Stabilization of a Virus-Like Particle and Its Application as a Nanoreactor at Physiological Conditions. *Biomacromolecules*, 18(11), 3492–3497. doi:10.1021/acs.biomac.7b00640
- Schwarz, B., Uchida, M., Douglas, T. 2017. Biomedical and Catalytic Opportunities of Virus-Like Particles in Nanotechnology. In *Advances in Virus Research* (Vol. 97). doi:10.1016/bs.aivir.2016.09.002
- Shenoy, R., Bowman, C. N. 2012. Kinetics of interfacial radical polymerization initiated by a glucose-oxidase mediated redox system. *Biomaterials*, 33(29), 6909–6914. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.06.014
- Solomon, M., Muro, S. 2017. Lysosomal enzyme replacement therapies: Historical development, clinical outcomes, and future perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 118, 109–134. doi:10.1016/j.addr.2017.05.004

- Speir, J. A., Munshi, S., Wang, G., Baker, T. S., Johnson, J. E. 1995. Structures of the native and swollen forms of cowpea chlorotic mottle virus determined by X-ray crystallography and cryo-electron microscopy. *Structure*, 3(1), 63–78. doi:10.1016/S0969-2126(01)00135-6
- Springer, C. J., Niculescu-Duvaz, I. 1997. Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT): a review. *Advanced drug delivery reviews*, 26(2–3), 151–172.
- Sultana, S., Khan, M. R., Kumar, M., Kumar, S., Ali, M. 2013. Nanoparticles-mediated drug delivery approaches for cancer targeting: a review. *Journal of Drug Targeting*, 21(2), 107–125. doi:10.3109/1061186X.2012.712130
- Swoboda, B. E. P., Massey, V. 1965. Purification and properties of the glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *The Journal of biological chemistry*, 240(5), 2209–2215.
- Tabb, M. M., Blumberg, B. 2006. New modes of action for endocrine-disrupting chemicals. *Molecular Endocrinology*, 20(3), 475–482. doi:10.1210/me.2004-0513
- Taboada-Puig, R., Junghanns, C., Demarche, P., Moreira, M. T., Feijoo, G., Lema, J. M., Agathos, S. N. 2011. Combined cross-linked enzyme aggregates from versatile peroxidase and glucose oxidase: Production, partial characterization and application for the elimination of endocrine disruptors. *Bioresource Technology*, 102(11), 6593–6599. doi:10.1016/j.biortech.2011.03.018
- Tapia-Moreno, A., Juarez-Moreno, K., Gonzalez-Davis, O., Cadena-Nava, R. D. R. D., Vazquez-Duhalt, R. 2017. Biocatalytic virus capsid as nanovehicle for enzymatic activation of Tamoxifen in tumor cells. *Biotechnology Journal*, 12(6), 1600706–1600713. doi:10.1002/biot.201600706
- Tarentino, A. L., Maley, F. 1974. Purification and properties of an endo  $\beta$  N acetylglucosaminidase from *Streptomyces griseus*. *Journal of Biological Chemistry*, 249(3), 811–817.
- Teschke, C. M., MCGough, A., Thuman-Commike, P. A. 2003. Penton Release from P22 Heat-Expanded Capsids Suggests Importance of Stabilizing Penton-Hexon Interactions during Capsid Maturation. *Biophysical Journal*, 84, 2585–2592.
- Tezuka, Y., Takahashi, K., Suzuki, T., Kitamura, S., Ohta, S., Nakamura, S., Mashino, T. 2007. Novel Metabolic Pathways of p-n-Nonylphenol Catalyzed by Cytochrome P450 and Estrogen Receptor Binding Activity of New Metabolites. *Journal of Health Science*, 53(5), 552–561. doi:10.1248/jhs.53.552
- Tulp, M. T. M., Sundström, G., Martron, L. B. J. M., Hutzinger, O. 1979. Metabolism of chlorodiphenyl ethers and irgasan® DP 300. *Xenobiotica*, 9(2), 65–77. doi:10.3109/00498257909038708
- Valderrama, B., Ayala, M., Vazquez-Duhalt, R. 2002. Suicide Inactivation of Peroxidases and the Challenge of Engineering More Robust Enzymes. *Chemistry & Biology*, 9(5), 555–565. doi:10.1016/S1074-5521(02)00149-7

- Vidal-Limón, A., Águila, S., Ayala, M., Batista, C. V., Vazquez-Duhalt, R. 2013. Peroxidase activity stabilization of cytochrome P450(BM3) by rational analysis of intramolecular electron transfer. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 122, 18–26.
- Vilela, C. L. S., Bassin, J. P., Peixoto, R. S. 2018. Water contamination by endocrine disruptors: Impacts, microbiological aspects and trends for environmental protection. *Environmental Pollution*, 235, 546–559. doi:10.1016/j.envpol.2017.12.098
- Vriezema, D. M., Comellas Aragonès, M., Elemans, J. A. A. W., Cornelissen, J. J. L. M., Rowan, A. E., Nolte, R. J. M. 2005. Self-Assembled Nanoreactors. *Chemical reviews*, 105(4), 1445–1490.
- Weber, E., Sirim, D., Schreiber, T., Thomas, B., Pleiss, J., Hunger, M., Gläser, R., Urlacher, V. B. 2010. Immobilization of P450 BM-3 monooxygenase on mesoporous molecular sieves with different pore diameters. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 64(1–2), 29–37. doi:10.1016/j.molcatb.2010.01.020
- Werck-Reichhart, D., Feyereisen, R. 2000. Cytochromes P450: a success story. *Genome biology*, 1(6), 3003.1-3003.9. doi:10.1186/gb-2000-1-6-reviews3003
- Wilkerson, J. W., Yang, S. O., Funk, P. J., Stanley, S. K., Bundy, B. C. 2018. Nanoreactors: Strategies to encapsulate enzyme biocatalysts in virus-like particles. *New Biotechnology*, 44(April), 59–63. doi:10.1016/j.nbt.2018.04.003
- Wine, Y., Cohen-Hadar, N., Freeman, A., Frolow, F. 2007. Elucidation of the mechanism and end products of glutaraldehyde crosslinking reaction by X-ray structure analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(3), 711–718. doi:10.1002/bit.21459
- Wu, Y., Chitranshi, P., Loukotková, L., Gamboa da Costa, G., Beland, F. A., Zhang, J., Fang, J. L. 2017. Cytochrome P450-mediated metabolism of triclosan attenuates its cytotoxicity in hepatic cells. *Archives of Toxicology*, 91(6), 2405–2423. doi:10.1007/s00204-016-1893-6
- Xia, H., Wang, Q. 2003. Preparation of conductive polyaniline/nanosilica particle composites through ultrasonic irradiation. *Journal of Applied Polymer Science*, 87(11), 1811–1817. doi:10.1002/app.11627
- Xie, T., Wang, A., Huang, L., Li, H., Chen, Z., Wang, Q. 2009. Recent advance in the support and technology used in enzyme immobilization. *African Journal of Biotechnology*, 8(19), 4724–4733.
- Xu, G., McLeod, H. L. 2001. Strategies for enzyme/prodrug cancer therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 7(11), 3314–3324.
- Xu, X., Li, B., Lu, H., Zhang, Z., Wang, H. 2007. The interface structure of nano-SiO<sub>2</sub> /PA66 composites and its influence on material's mechanical and thermal properties. *Applied Surface Science*, 254(5), 1456–1462. doi:10.1016/j.apsusc.2007.07.014

- Yari, M., Ghoshoon, M. B., Vakili, B., Ghasemi, Y. 2017. Therapeutic Enzymes: Applications and Approaches to Pharmacological Improvement. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 18(7). doi:10.2174/1389201018666170808150742
- Yuliah, Y., Bahtiar, A., Fitrilawati, Siregar, R. E. 2016. The optical band gap investigation of PVP-capped ZnO nanoparticles synthesized by sol-gel method. *En AIP Conference Proceedings*, 2016, 1712, pp. 5447. doi:10.1063/1.4941901
- Zeltins, A. 2013. Construction and Characterization of Virus-Like Particles: A Review. *Molecular Biotechnology*, 53(1), 92–107. doi:10.1007/s12033-012-9598-4
- Zhao, L., Güven, G., Li, Y., Schwaneberg, U. 2011. First steps towards a Zn/Co(III)sep-driven P450 BM3 reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(4), 989–999. doi:10.1007/s00253-011-3290-7
- Zhao, M., Biswas, A., Hu, B., Joo, K. II, Wang, P., Gu, Z., Tang, Y. 2011. Redox-responsive nanocapsules for intracellular protein delivery. *Biomaterials*, 32(22), 5223–5230. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.03.060
- Zlotnick, A., Suhanovsky, M. M., Teschke, C. M. 2012. The energetic contributions of scaffolding and coat proteins to the assembly of bacteriophage procapsids. *Virology*, 428(1), 64–69. doi:10.1016/j.virol.2012.03.017