

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



**“PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS
ENCAPSULINAS DE *Thermotoga maritima* PRODUCIDAS EN UN
SISTEMA DE EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE *Escherichia coli*”**

Presentada por:

WALTER JOEL CISNEROS YUPANQUI

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Lima – Perú

2022

La UNALM es la titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación
(Art. 24. Reglamento de Propiedad Intelectual)

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS
ENCAPSULINAS DE *Thermotoga maritima* PRODUCIDAS EN UN
SISTEMA DE EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE *Escherichia coli*”**

Presentada por:

WALTER JOEL CISNEROS YUPANQUI

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Dra. Doris Elizabeth Zúñiga Dávila
PRESIDENTE

Dr. Ernesto Aldo Ormeño Orrillo
MIEMBRO

Dr. Roberto Carlos Mansilla Samaniego
MIEMBRO

Dra. Gretty Katherina Villena Chávez
ASESORA

Dr. Daniel Guerra Giraldez
Co - Asesor

DEDICATORIA

El presente trabajo va dedicado al gran esfuerzo y apoyo incondicional de mis padres que hasta el día de hoy tengo la fortuna de poder recibirlos.

También sumar a mi hermana que de alguna manera posee el estímulo verbal de hacerme reaccionar cuando las tareas procrastinan mucho.

Y, por último, pero no menos importante, a mi complemento emocional, a mi novia.

¡Los amo mucho!

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis se realizó gracias a que fue financiado por CONCYTEC, PROCIENCIA y SENCICO en el marco de la convocatoria de Proyectos de Investigación Aplicada 2018 – 01 (número de contrato 119–2018).

Agradezco a la Dra. Gretty Villena por el apoyo brindado desde el momento que la conocí en mi primera clase teórica de Biología General hasta la actualidad. La oportunidad de haber sido parte del Laboratorio de Biotecnología y Micología contribuyó a mi desarrollo académico y profesional.

Al Dr. Daniel Guerra por abrirme las puertas del Laboratorio de Moléculas Individuales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH) y por los múltiples consejos alentadores a lo largo de todo este proyecto que me hicieron una persona más responsable.

Al comité del jurado que también han sido mis maestros en este camino para convertirme en Biólogo.

¡Muchas gracias a todos!

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	viii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	4
2.1. Jaulas proteicas	4
2.1.1. Características generales	4
2.1.2. Clasificación.....	5
2.1.3. Función	5
2.1.4. Aplicaciones	5
2.2. Encapsulinas	6
2.2.1. Características generales	6
2.2.2. Clasificación.....	6
2.2.3. Función	7
2.2.4. Aplicaciones	9
2.3. Métodos de biología molecular.....	10
2.3.1. Aspectos generales	10
2.3.2. Tecnologías del ADN recombinante	10
2.3.3. Expresión heteróloga de proteínas.....	11
2.3.4. Electroforesis.....	12
2.3.4.1. Electroforesis de ADN	12
2.3.4.2. Electroforesis de proteínas	13
2.4. Cromatografía de proteínas	14
2.4.1. Aspectos generales	14
2.4.2. Cromatografía de exclusión molecular	14
2.4.3. Cromatografía multimodal.....	15

2.5. Caracterización de proteínas.....	16
2.5.1. Aspectos generales	16
2.5.2. Dispersión de luz dinámica	17
III. METODOLOGÍA.....	19
3.1. Material biológico y plásmidos.....	19
3.2. Material de laboratorio e insumos.....	19
3.3. Equipos de laboratorio	20
3.4. Métodos.....	21
3.4.1. Diseño del plásmido contenedor de la secuencia codificadora del gen de capsulina de <i>T. maritima</i>	21
3.4.2. Resuspensión, transformación y extracción del plásmido “Encap_eGFP_opti_Samira_pUC57”	21
3.4.3. Obtención del inserto para la ligación a partir del plásmido “Encap_eGFP_opti_Samira_pUC57”	22
3.4.4. Transformación y extracción del plásmido “pET_Duet”.....	22
3.4.5. Obtención del vector de expresión para la ligación a partir del plásmido “pET_Duet”	23
3.4.6. Obtención mediante ligación, transformación y extracción del plásmido “pET_Duet_Encap”	23
3.4.7. Expresión de proteínas capsulina a partir del plásmido “pET_Duet_Encap”	23
3.4.8. Purificación de proteínas capsulinas	25
3.4.9. Caracterización de proteínas capsulinas mediante la técnica de DLS	25
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	26
4.1. Diseño del plásmido “Encap_eGFP_opti_Samira_pUC57”	26
4.2. Transformación y extracción del plásmido “Encap_eGFP_opti_ Samira_pUC57” para la obtención del inserto usado en la ligación.....	27

4.3. Transformación y extracción del plásmido “pET_Duet” para la obtención del vector de expresión usado en la ligación	29
4.4. Obtención mediante ligación, transformación y extracción del plásmido “pET_Duet_Encap”	32
4.5. Expresión de proteínas encapsulinas a partir del plásmido “pET_Duet_Encap”	38
4.6. Purificación de proteínas encapsulinas a través del equipo “FPLC AKTA EXPLORER”	39
4.7. Caracterización de proteínas encapsulinas mediante la técnica de DLS a través del equipo “BROOKHAVEN 90PLUS”	43
V. CONCLUSIONES	47
VI. RECOMENDACIONES	48
VII. BIBLIOGRAFÍA	49
VIII. ANEXOS.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Modelos estructurales de algunas jaulas proteicas.....	4
Figura 2: Comparación estructural de los monómeros y subunidades ensambladas de tres encapsulinas de especies diferentes..	7
Figura 3: Estructura cristalina de la encapsulina de <i>T. maritima</i>	8
Figura 4: Representación de la relación de los genes del CLP y la proteína de carga en algunas bacterias.	9
Figura 5: Tecnologías del ADN recombinante.....	11
Figura 6: Representación esquemática de la expresión heteróloga de un gen de interés en <i>E. coli</i>	12
Figura 7: Cromatografía de exclusión molecular o permeación en gel	15
Figura 8: Posibilidades de grupos químicos del ligando de una resina en la cromatografía multimodal	16
Figura 9: Fundamento del método de dispersión de luz dinámica (DLS).....	18
Figura 10: Mapa de la secuencia diseñada que contiene al gen de encapsulina de <i>T. maritima</i> . También se observan las secuencias “eGFP” y “Ferritina_tag”.....	26
Figura 11: Placas obtenidas en el proceso de la transformación del plásmido “Encap_eGFP_opti_Samira_pUC57”	27
Figura 12: Gel de electroforesis para comprobar la identidad del plásmido “Encap_eGFP_opti_Samira_pUC57”	28
Figura 13: Placas obtenidas en el proceso de la transformación del plásmido “pET_Duet”	30
Figura 14: Gel de electroforesis para comprobar la identidad del plásmido “pET_Duet”	31
Figura 15: Placas obtenidas en el proceso de la transformación del plásmido producto de la ligación.	33
Figura 16: Primer gel de electroforesis obtenido a partir de la PCR de todas las colonias transformantes del plásmido producto de la ligación.....	34

Figura 17: Segundo gel de electroforesis obtenido a partir de la PCR de todas las colonias transformantes del plásmido producto de la ligación.....	35
Figura 18: Gel de electroforesis para comprobar la identidad del plásmido “pET_Duet_Encap”..	36
Figura 19: Gel de electroforesis para comprobar la identidad del plásmido “pET_Duet_Encap” (continuación)..	37
Figura 20: SDS – PAGE para comprobar el sistema de expresión de las proteínas encapsulinas.....	38
Figura 21: Cromatograma del filtrado añadido a la columna “HiScreen CaptoCore 700”. Se recolectaron las fracciones pertenecientes al “Flowthrough” (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11 y A12).....	40
Figura 22: SDS – PAGE de las fracciones obtenidas con la columna “HiScreen CaptoCore 700”	40
Figura 23: SDS – PAGE de las fracciones obtenidas con la columna “HiScreen CaptoCore 700” (continuación).....	41
Figura 24: Cromatograma del sobrenadante añadido a la columna “HiLoad 26/600”.	41
Figura 25: SDS – PAGE de las fracciones obtenidas con la columna “HiLoad 26/600”. ...	42
Figura 26: SDS – PAGE del proceso total de purificación	42
Figura 27: Resultado del análisis mediante DLS obtenido con la primera dilución de la muestra de encapsulina.	44
Figura 28: Resultado del análisis mediante DLS obtenido con la segunda dilución de la muestra de encapsulina.	45

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1.....	17
-----------------	----

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Mapa del plásmido “Encap_eGFP_opti_Samira_pUC57” y fragmentos relacionados	56
Anexo 2: Mapa del plásmido “pET_Duet” y fragmentos relacionados	57
Anexo 3: Mapa del plásmido “pET_Duet_Encap” y fragmentos relacionados	58

RESUMEN

Las encapsulinas son un tipo de jaulas proteicas de mucho interés por su gran potencial para aplicaciones en los campos de medicina, ingeniería química y biotecnología. La producción, purificación y caracterización de estas nanopartículas son necesarias para llevar a cabo investigaciones y posibles innovaciones tecnológicas basadas en ellas. El presente estudio tiene como objetivo obtener encapsulinas de *Thermotoga maritima* con alto grado de pureza y en escala de trabajo de laboratorio. Las proteínas fueron producidas en un sistema de expresión recombinante de *Escherichia coli*, purificadas por medio de cromatografía y caracterizadas mediante dispersión dinámica de luz (DLS). Los análisis de SDS – PAGE realizados confirmaron la pureza de las encapsulinas obtenidas y la técnica de DLS mostró valores muy cercanos al diámetro teórico de la nanopartícula (24 nm). Sin embargo, se propone el uso de microscopía electrónica de transmisión (TEM) para verificar los resultados de esta investigación y validar el correcto ensamblado de las encapsulinas producidas. Por último, agradecer enormemente al financiamiento otorgado por CONCYTEC, PROCIENCIA y SENCICO en el marco de la convocatoria de Proyectos de Investigación Aplicada 2018 – 01 (número de contrato 119 – 2018).

Palabras claves: Encapsulinas, jaulas proteicas, *Thermotoga maritima*, *Escherichia coli*, proteínas recombinantes, SDS – PAGE, purificación, caracterización, cromatografía, DLS.

ABSTRACT

Encapsulins are a type of protein cage of great interest due to its great potential for applications in the fields of medicine, chemical engineering and biotechnology. The production, purification and characterization of these nanoparticles are necessary to carry out research and possible technological innovations based on them. The present study aims to obtain encapsulins from *Thermotoga maritima* with a high degree of purity and on a laboratory scale. The proteins were produced in an *Escherichia coli* recombinant expression system, purified by means of chromatography and characterized by dynamic light scattering (DLS). The SDS-PAGE analyzes performed confirmed the purity of the encapsulins obtained and the DLS technique showed values very close to the theoretical diameter of the nanoparticle (24 nm). However, the use of transmission electron microscopy (TEM) is proposed to verify the results of this research and validate the correct assembly of the encapsulins produced. Finally, the financing granted by CONCYTEC, PROCIENCIA and SENCICO within the framework of the call for Applied Research Projects 2018 – 01 (contract number 119 – 2018) is greatly appreciated.

Keywords: Encapsulins, protein cages, *Thermotoga maritima*, *Escherichia coli*, recombinant proteins, SDS-PAGE, purification, characterization, chromatography, DLS.

I. INTRODUCCIÓN

En la naturaleza existen estructuras tridimensionales llamadas jaulas proteicas o proteínas huecas. Tienen como principal característica autoensamblarse a partir de múltiples copias de un solo o pocos tipos de monómeros de proteínas en complejas estructuras nanoscópicas con cavidades internas protegidas que pueden albergar moléculas de carga (Aumiller et al., 2018). Algunos ejemplos de jaulas proteicas incluyen proteínas de choque térmico, ferritinas, carboxisomas, vesículas de clatrina, encapsulinas, chaperoninas, partículas similares a virus (VLP), cápsides virales, entre otras. Las actividades biológicas que pueden desempeñar son muy diversas, tales como transporte de cargas virales, biomineralización, plegamiento de proteínas y degradación, encapsulación enzimática e incluso catálisis de rutas metabólicas cortas (Sasaki et al., 2017). Debido a la complejidad de estas funciones, Sasaki et al. (2017) también mencionan que estas proteínas huecas están siendo usadas como nanorreactores personalizados, vehículos de entrega orgánulos artificiales para numerosas aplicaciones en medicina, ciencia de materiales y biología sintética.

Durante los últimos años, se viene estudiando un tipo de jaulas proteicas proveniente de bacterias denominadas encapsulinas. Estas nanopartículas son complejos que poseen estructura icosaédrica y se ha descrito para ellas dos arquitecturas hasta el momento (Giessen, 2016). Unas se ensamblan a partir de 60 copias de protómeros o monómeros idénticos con un número de triangulación igual a 1 ($T = 1$) y poseen un diámetro de entre 20 y 24 nm. Algunas de las bacterias donde se han encontrado este tipo de encapsulina son *Thermotoga maritima*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Rhodococcus erythropolis* y *Rhodococcus jostii*. Por otro lado, Giessen (2016) también describe otras encapsulinas que se forman a partir de 180 subunidades de proteínas idénticas con un número de triangulación igual a 3 ($T=3$), cuyo diámetro está en un rango de 28 a 32 nm. Encapsulinas de este tipo se hallan en bacterias como *Pyrococcus furiosus* y *Myxococcus xanthus* (Giessen, 2016). La función de las encapsulinas no está definida totalmente, pero la delección de su gen provoca fenotipos que se han reconocido en algunas bacterias. Por ejemplo, la eliminación del gen de encapsulina tornó a *M. xanthus* más susceptible al estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno en comparación con el tipo silvestre (McHugh et al., 2014). Otros estudios

presentan indicios de una función en el metabolismo del nitrógeno (Tracey et al., 2019), la degradación de lignina (Rahmanpour & Bugg, 2013) y en aislar reacciones de peroxidación potencialmente tóxicas (McHugh et al., 2014).

Las encapsulinas son objeto de gran interés biotecnológico por su capacidad de albergar moléculas y por ser relativamente sencillas de analizar y producir. A diferencia de ellas, los carboxisomas, que son la maquinaria central de fijación de dióxido de carbono en cianobacterias (Shively et al., 1973), forman jaulas proteicas compuestas por diferentes tipos de monómeros (Fang et al., 2018), por lo que una producción artificial sería relativamente muy compleja. En cambio, las encapsulinas al estar hechas de 60 o 180 copias de un solo protómero idéntico, un procedimiento único de purificación serviría para producir jaulas proteicas completas o listas para ser reintegradas mediante el ensamblado *in vitro*. Algunos estudios evaluaron la capacidad de carga específica de las encapsulinas ensambladas *in vivo*. Las moléculas incorporadas dentro del nanocompartimento son proteínas que poseen una etiqueta peptídica C – terminal de 10 a 40 aminoácidos de longitud, que fue comprobada necesaria y suficiente para mediar la interacción entre las proteínas de carga y la superficie interior de la encapsulina (Giessen, 2016). Por otro lado, también se demostró su estabilidad dentro de un amplio rango de pH y temperatura (Rahmanpour & Bugg, 2013; Rurup et al., 2014). Todos estos hechos permiten proponer el uso de las encapsulinas para desarrollar una nanoplataforma de entrega de carga, permitiendo así una serie de aplicaciones como sistemas de administración de proteínas con fines terapéuticos o diagnósticos específicos, contenedores de proteínas y nanorreactores (Giessen, 2016).

Para llevar a cabo estudios bioquímicos sobre las proteínas encapsulinas y posibles desarrollos tecnológicos basados en ellas, es necesario aislarlas en alta pureza y en condiciones que favorezcan su estabilidad. Los métodos más utilizados en la purificación de encapsulinas se basan en la ultracentrifugación, que permite separarlas del resto de proteínas según su densidad a través de un gradiente de líquido viscoso, típicamente sacarosa o cloruro de cesio (Orner, 2015). Dado que las encapsulinas tienen un tamaño único en comparación con otras macromoléculas y los orgánulos celulares, la tasa de migración puede usarse como una herramienta para la purificación. Sin embargo, la ultracentrifugación requiere un equipo muy costoso, por lo que se buscó adaptar localmente el uso de nuevos procedimientos de cromatografía (Lagoutte et al., 2016).

La cromatografía ha demostrado ser efectiva para la purificación de encapsulinas gracias a la mejora de resinas durante los últimos años (Mach et al., 2006). Gracias a ello, ahora se permite la obtención de proteínas encapsulinas con un mayor grado de pureza (Effio & Hubbuch, 2015). No obstante, en el Perú aún no ha sido reportada una aplicación de dichos métodos de separación para estas nanopartículas, así como tampoco su caracterización mediante dispersión de luz dinámica (DLS).

Por esas razones, por interés científico y como primera experiencia local para implementar la producción, purificación y caracterización inicial de encapsulinas, se planteó como necesaria una adaptación de los protocolos disponibles en las revistas científicas.

En el presente trabajo, se diseñó un plásmido para conseguir la producción de proteínas encapsulinas de *T. maritima* en un sistema de expresión recombinante de *Escherichia coli*. Dichas proteínas fueron extraídas por medio de cromatografía, y su pureza fue analizada mediante SDS – PAGE. Las nanopartículas presentes en el producto final de purificación fueron caracterizadas usando la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS), que entrega información acerca del tamaño y distribución de las partículas.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1. Jaulas proteicas

2.1.1. Características generales

Los términos "jaula proteica" o "proteína hueca" describen una diversidad de estructuras que comparten la característica de poseer muchas copias de un solo o pocos tipos de subunidades proteicas que se autoensamblan en nanopartículas con al menos una cavidad. Esta cavidad es lo suficientemente grande como para encerrar moléculas inorgánicas, ácidos nucleicos y otras proteínas (Rother et al., 2016).

En la naturaleza, las jaulas proteicas presentan una amplia variación de morfologías, tamaños y simetrías relacionadas (Figura 1) (Aumiller et al., 2018). Por ejemplo, la ferritina es una esfera hueca que tiene un diámetro de aproximadamente 12 nm y consta de 24 monómeros proteicos. Otro modelo es la cápside del bacteriófago P22. Esta mide 58 nm de diámetro y se ensambla a partir de 420 subunidades (Rother et al., 2016).

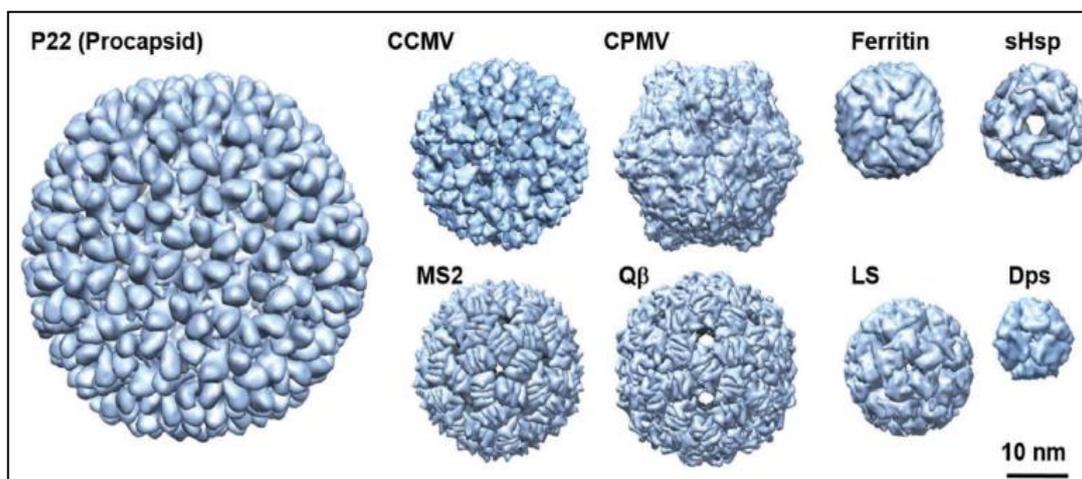


Figura 1: Modelos estructurales de algunas jaulas proteicas. Estas imágenes se realizaron utilizando el programa USCF Chimera. Bacteriófago "P22" (56 nm de diámetro, T = 7), virus del moteado clorótico del caupí "CCMV" (28 nm, T = 3), virus del mosaico del caupí "CPMV" (30 nm, pseudo T = 3), bacteriófago "MS2" (27 nm, T = 3), bacteriófago "Qβ" (30 nm, T = 3), ferritina "Ferritin" (12 nm), proteínas pequeñas de choque térmico "sHsp" (12 nm), lumazina sintasa "LS" (15 nm, T = 1) y proteínas de unión al ADN "Dps" (9 nm).

FUENTE: Adaptado de "Protein cage assembly across multiple length scales" por Aumiller, W.M.; Uchida, M. & Douglas, T. (2018). *Chemical Society Reviews*, 47(10).

2.1.2. Clasificación

Es posible clasificar a las proteínas huecas en jaulas no virales y partículas parecidas a virus (VLP). Algunos ejemplos de jaulas no virales son las ferritinas, proteínas de choque térmico, lumazina sintasa, encapsulinas, entre otras. La mayoría de este tipo posee una forma esferoide. Por otro lado, las VLP derivan de virus nativos, pero carecen de ADN o ARN viral encapsulado. En este grupo se incluyen estructuras provenientes del virus del mosaico del tabaco (TMV), virus del mosaico del caupí (CPMV), virus del moteado clorótico del caupí (CCMV), bacteriófago M13, bacteriófago MS2, adenovirus (Adv), entre otros ejemplos. Estas jaulas pueden tener la misma estructura de las cápsides del virus del cual provienen; sin embargo, también es probable que difieran en morfología, tamaño y número de subunidades. Se puede encontrar mucha variedad morfológica en las VLP, por ejemplo, el TMV y bacteriófago M13 son virus en forma de bastón; mientras que los CPMV, CCMV, bacteriófagos MS2 y adenovirus tienen estructuras icosaédricas (Rother et al., 2016).

2.1.3. Función

La función biológica de las jaulas proteicas mencionadas anteriormente es diferente para cada tipo; no obstante, todas tienen el objetivo común de albergar y proteger la carga encapsulada. Por ejemplo, en la naturaleza se observa que las cápsides brindan protección al genoma viral que está contenido dentro de sus estructuras, y fue esta característica en especial lo que promovió el desarrollo de VLP artificiales posteriormente (Aumiller et al., 2018). Otro es el caso de las ferritinas, una de las jaulas más estudiadas que desempeñan un papel biológico importante en el almacenamiento de óxido férrico y la homeostasis del hierro (Y. Zhang et al., 2016).

2.1.4. Aplicaciones

La capacidad de autoensamblaje y la función principal de albergar moléculas de las jaulas proteicas ha despertado el interés de la ciencia. Actualmente, existen investigaciones que revelan una serie de aplicaciones en las que se han utilizado jaulas de proteínas, particularmente las VLP. Se las puede encontrar en los ámbitos de medicina (vacunas, terapia génica, administración de medicamentos, ingeniería de tejidos), biotecnología (biosensores, nanorreactores) y energía (catalizadores, electrodos de batería, almacenamiento de datos) (Aumiller et al., 2018).

2.2. Encapsulinas

2.2.1. Características generales

Las encapsulinas son un tipo de jaulas proteicas no virales recientemente descubiertas (Giessen & Silver, 2016). Estas nanopartículas están muy extendidas en bacterias y arqueas. Por ejemplo, se han identificado encapsulinas en *T. maritima*, *M. tuberculosis*, *R. erythropolis*, *R. jostii*, *P. furiosus*, *M. xanthus*, entre otros microorganismos (Giessen & Silver, 2017). El análisis estructural indica que estas proteínas huecas presentan múltiples poros que pueden controlar el intercambio de moléculas pequeñas entre el citosol y el interior de la encapsulina (Nichols et al., 2017).

2.2.2. Clasificación

Actualmente se puede clasificar a las encapsulinas de acuerdo a la cantidad de monómeros implicados en el autoensamblaje. Algunas forman estructuras icosaédricas de 60 subunidades idénticas ($T = 1$, diámetro = 20 - 24 nm) y otras de 180 ($T = 3$, diámetro = 28 – 32 nm) (Figura 2) (Giessen & Silver, 2016). También es importante mencionar que existe otra propuesta de clasificación basada en el análisis de secuencia de todos los supuestos genes de encapsulina, los diferentes tamaños de nanocompartimientos ensamblados, las proteínas de carga y su supuesta función. Esta las divide en cuatro familias: (1) encapsulinas fusionadas con proteínas parecidas a ferritinas (Flp), (2) encapsulinas $T = 1$, (3) encapsulinas $T = 3$ y (4) encapsulinas similares a las $T=3$. Este análisis se basó en genes de encapsulina putativos de los cuales la mayoría no se han caracterizado, lo que significa que todavía es susceptible de cambio (Giessen & Silver, 2017).

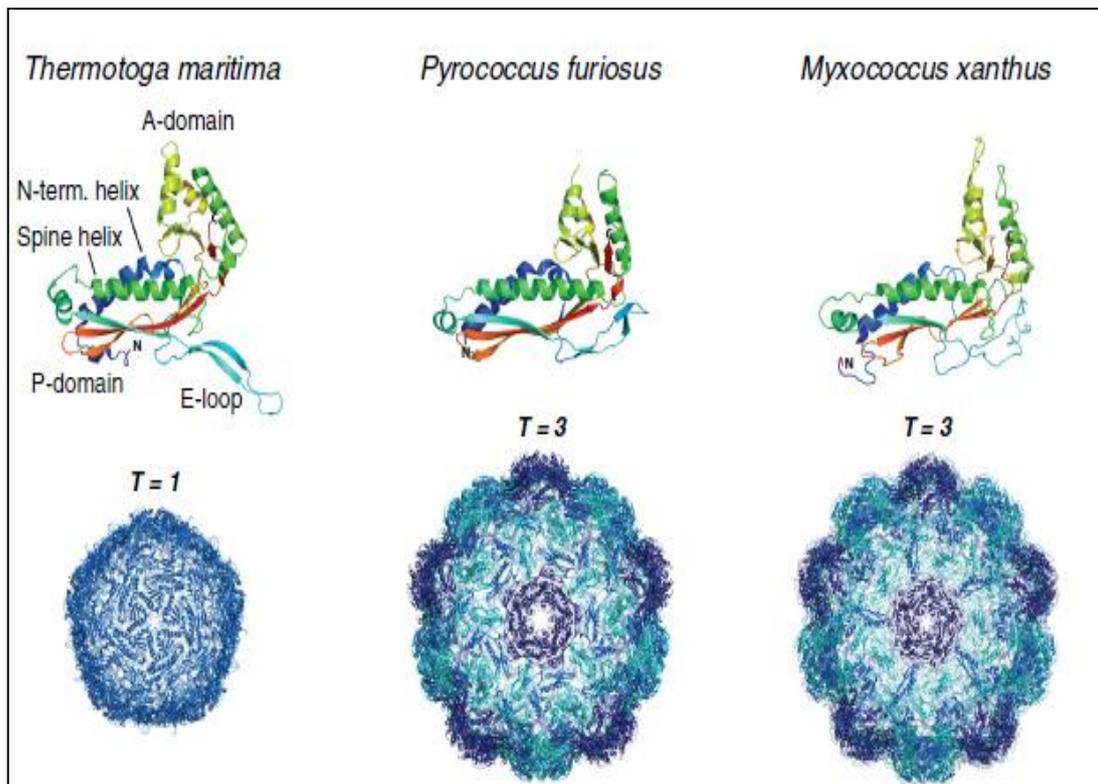


Figura 2: Comparación estructural de los monómeros y subunidades ensambladas de tres encapsulinas de especies diferentes. Estas imágenes se realizaron utilizando el software Protein Data Bank (PDB). **FUENTE:** Adaptado de “Encapsulins: Microbial nanocompartments with applications in biomedicine, nanobiotechnology and materials science” por Giessen, T. W. (2016). *Current Opinion in Chemical Biology*, 34, 1-10.

2.2.3. Función

El rol fisiológico del nanocompartimento de encapsulina aún es desconocido; sin embargo, las proteínas que son incorporadas dentro de ella naturalmente (proteínas de carga nativas) indican que puede estar involucradas en la protección contra el estrés oxidativo. Por ejemplo, en las encapsulinas de *Brevibacterium linens* se encontraron peroxidasas DyP (peroxidasas decolorantes) (Nichols et al., 2017). También se cree que participan en la homeostasis del hierro al descubrir como moléculas de carga unas proteínas similares a ferritina (Flp) en *T. maritima* (McHugh et al., 2014).

Algunos componentes que participan de estos procesos son peligrosos para un organismo. Los sustratos y productos en las reacciones catalizadas por peroxidasas a menudo son tóxicos (especies reactivas de oxígeno, ROS), mientras que las altas concentraciones de iones de hierro tampoco son deseadas en una célula. Por lo tanto, la compartimentación de estos productos evitaría el daño a la célula mientras aún puede realizar estas reacciones o mantener la homeostasis del hierro (McHugh et al., 2014). Por otro lado, basándose en las secuencias de algunas otras proteínas de carga nativas, se ha propuesto la participación de las

encapsulinas en la fijación de carbono, la resistencia al estrés nitrosativo y la oxidación anaeróbica de amonio (Giessen & Silver, 2017).

Otra cuestión importante relacionada con la función de las encapsulinas es la presencia de una pequeña secuencia de aminoácidos en sus diversas proteínas de carga nativas (Cassidy-Amstutz et al., 2016). Análisis bioinformáticos han demostrado que esta secuencia es una etiqueta peptídica C – terminal de 10 a 40 aminoácidos de longitud que se conserva en muchas especies (Sutter et al., 2008). Desde entonces, otras investigaciones verificaron que la secuencia C – terminal, denominada péptido de carga (CLP), es suficiente para cargar una proteína de carga en el complejo de encapsulina (Figura 3) (Nichols et al., 2017).

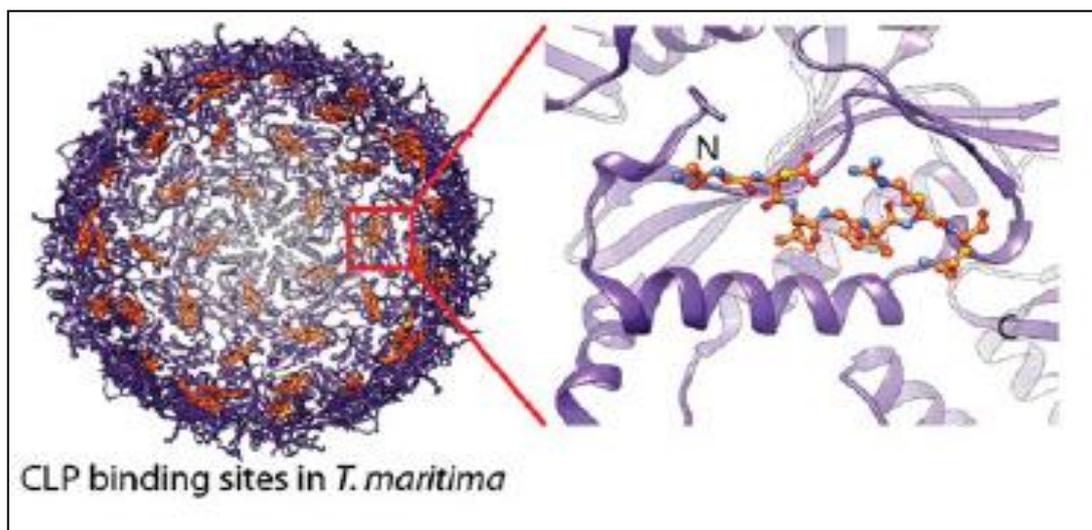


Figura 3: Estructura cristalina de la encapsulina de *T. maritima*. Se marcan de color rojo las regiones hidrofóbicas responsables de interactuar con el CLP. Estas regiones se encuentran en cada subunidad del complejo ensamblado. Las imágenes se realizaron utilizando el software Protein Data Bank (PDB). **FUENTE:** Adaptado de “Encapsulins: Molecular biology of the shell” por Nichols, R. J.; Cassidy-Amstutz, C.; Chaijarasphong, T. & Savage, D. F. (2017). *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 52(5), 583-594.

Sin embargo, el CLP no está limitado al C – terminal. En algunos casos, la encapsulina es capaz de albergar dos tipos diferentes de proteínas de carga; una de ellas posee el CLP típico y la otra contiene una etiqueta peptídica N – terminal. Este ejemplo se observó en bacterias del filo Firmicutes (Giessen & Silver, 2017). Por otro lado, en *P. furiosus*, la proteína de carga carece de un CLP y el gen que la codifica se fusiona con el gen de encapsulina para expresar o producir un polipéptido único (Figura 4) (Akita et al., 2007).

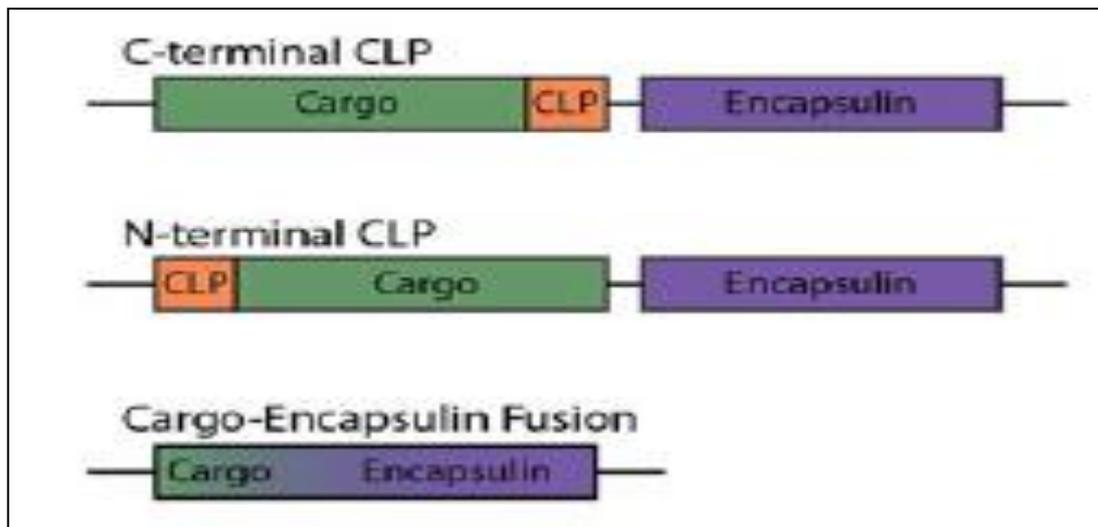


Figura 4: Representación de la relación de los genes del CLP y la proteína de carga en algunas bacterias. La secuencia de codificación del CLP puede situarse en el extremo 3' (C – terminal) o 5' (N – terminal) del gen de la proteína de carga. En algunos casos, la fusión del gen de la proteína de carga con el gen de encapsulina permite prescindir de un CLP.

FUENTE: Adaptado de “Encapsulins: Molecular biology of the shell” por Nichols, R. J.; Cassidy-Amstutz, C.; Chaijarasphong, T. & Savage, D. F. (2017). *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 52(5), 583-594.

2.2.4. Aplicaciones

Las encapsulinas pueden modificarse fácilmente para cumplir una función deseada. Por ejemplo, es posible albergar proteínas de carga no nativas dentro de las encapsulinas al unirles la secuencia CLP en el extremo C – terminal (Giessen, 2016).

Algunos investigadores han propuesto el uso de las encapsulinas como sistemas de administración de fármacos y nanorreactores. Por ejemplo, Giessen y Silver (2016) aprovecharon su arquitectura fija y tamaño para la producción de nanopartículas de plata. Esto se logró modificando genéticamente a la proteína encapsulina de *T. maritima* para incluir en ella una secuencia que permita la precipitación de plata. Por otro lado, también se comprobó que las encapsulinas pueden convertirse en sistemas de administración de fármacos terapéuticos dirigidos, por ejemplo, mediante la inserción de un péptido en la superficie de la encapsulina que sea reconocido específicamente por una célula blanco. Esto abre la puerta a un nuevo método para combatir enfermedades de manera menos invasiva (Moon et al., 2014).

Estas aplicaciones muestran que el progreso en el uso de las encapsulinas alberga un gran potencial en los campos de medicina, ingeniería química y biotecnología (Giessen, 2016).

2.3. Métodos de biología molecular

2.3.1. Aspectos generales

El desarrollo de métodos para estudiar procesos a nivel molecular ha llevado a nuevas y eficaces formas de aislar, analizar, manipular los ácidos nucleicos y proteínas. Al considerar la utilidad potencial de las técnicas de biología molecular, es importante comprender y conocer la estructura básica del ADN, ARN y aminoácidos. De hecho, muchas técnicas utilizadas imitan de cierta forma las funciones naturales de estas moléculas, tales como la replicación, transcripción y traducción. Por lo tanto, los métodos de biología molecular son indispensables para el estudio de las proteínas encapsulinas (Wilson & Walker, 2009).

2.3.2. Tecnologías del ADN recombinante

Las tecnologías del ADN recombinante son procedimientos que se utilizan para unir o recombinar múltiples fragmentos de ADN de diferente origen. Esto es posible debido a que las moléculas de ADN de todos los organismos comparten la misma estructura química y difieren solo en la secuencia de nucleótidos (Siddiqui, 1982). Uno de los métodos más usados para unir fragmentos se basa en el uso de enzimas de restricción. Las moléculas diana de estas enzimas son secuencias palindrómicas de ADN. Allí realizan cortes y dejan como resultado fragmentos con extremos cohesivos o romos que posteriormente se unirán con la cadena de interés correspondiente (Figura 5) (Pham, 2018).

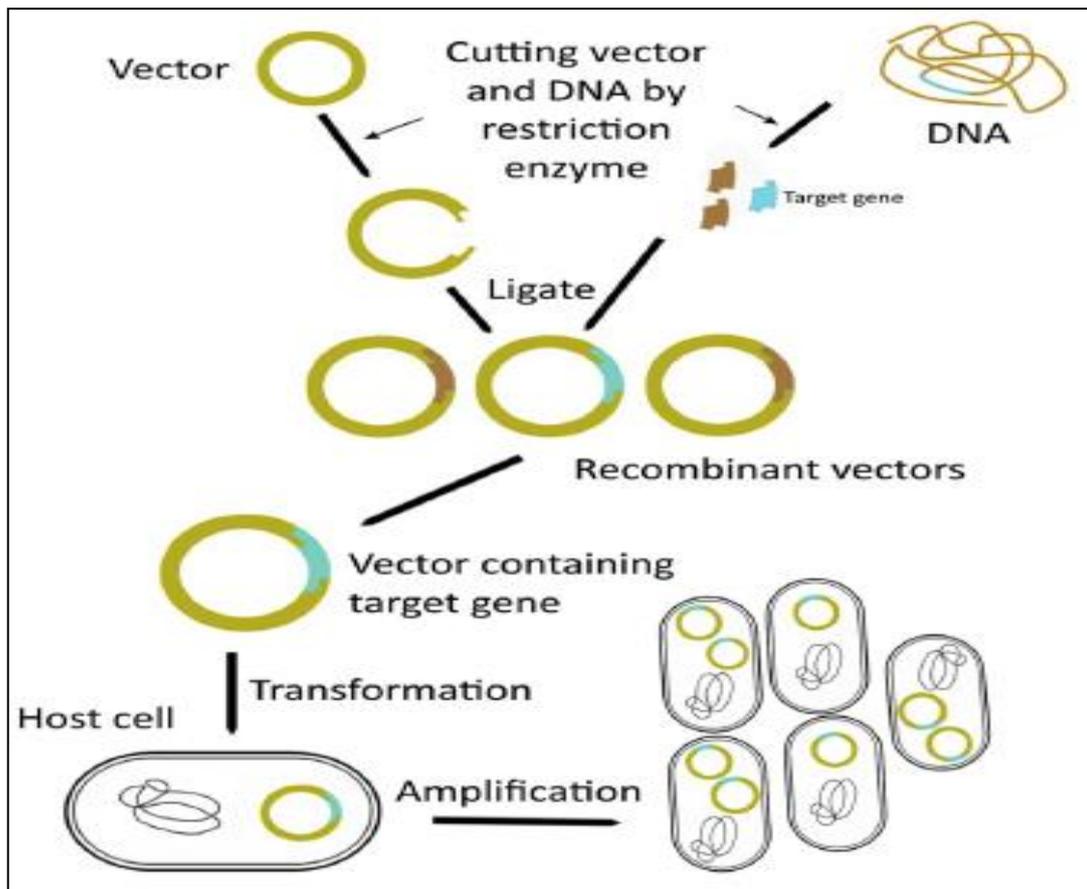


Figura 5: Tecnologías del ADN recombinante. (1) Cortar el ADN deseado usando enzimas de restricción, (2) insertar los genes en vectores o plásmidos, (3) transferir los vectores a una célula (generalmente *E. coli*) y (4) obtener los productos a partir de los genes recombinantes.

FUENTE: Adaptado de “Chapter 19 - Medical Biotechnology: Techniques and Applications” por Pham, P. V. (2018). *Omics Technologies and Bio-Engineering* (pp. 449-469). Academic Press.

2.3.3. Expresión heteróloga de proteínas

La producción de proteínas recombinantes o heterólogas se ha convertido en una técnica estándar que típicamente implica la clonación del gen apropiado en un plásmido vector para su expresión bajo el control de un promotor inducible (Figura 6). La calidad y rendimiento de la expresión depende de una variedad de factores provenientes de la complejidad del organismo huésped, las características estructurales únicas de la proteína, la estabilidad del ARNm, el plegamiento favorable de la proteína, la frecuencia del uso de codones, la degradación de la proteína recombinante por las proteasas dependientes de ATP y la toxicidad de la proteína (Schumann & Ferreira, 2004).

La facilidad de manipulación genética, el bajo costo, el rápido crecimiento y la abundancia de estudios previos han convertido a *E. coli* en una de las especies de microorganismos más utilizadas para producir proteínas recombinantes (Jia & Jeon, 2016).

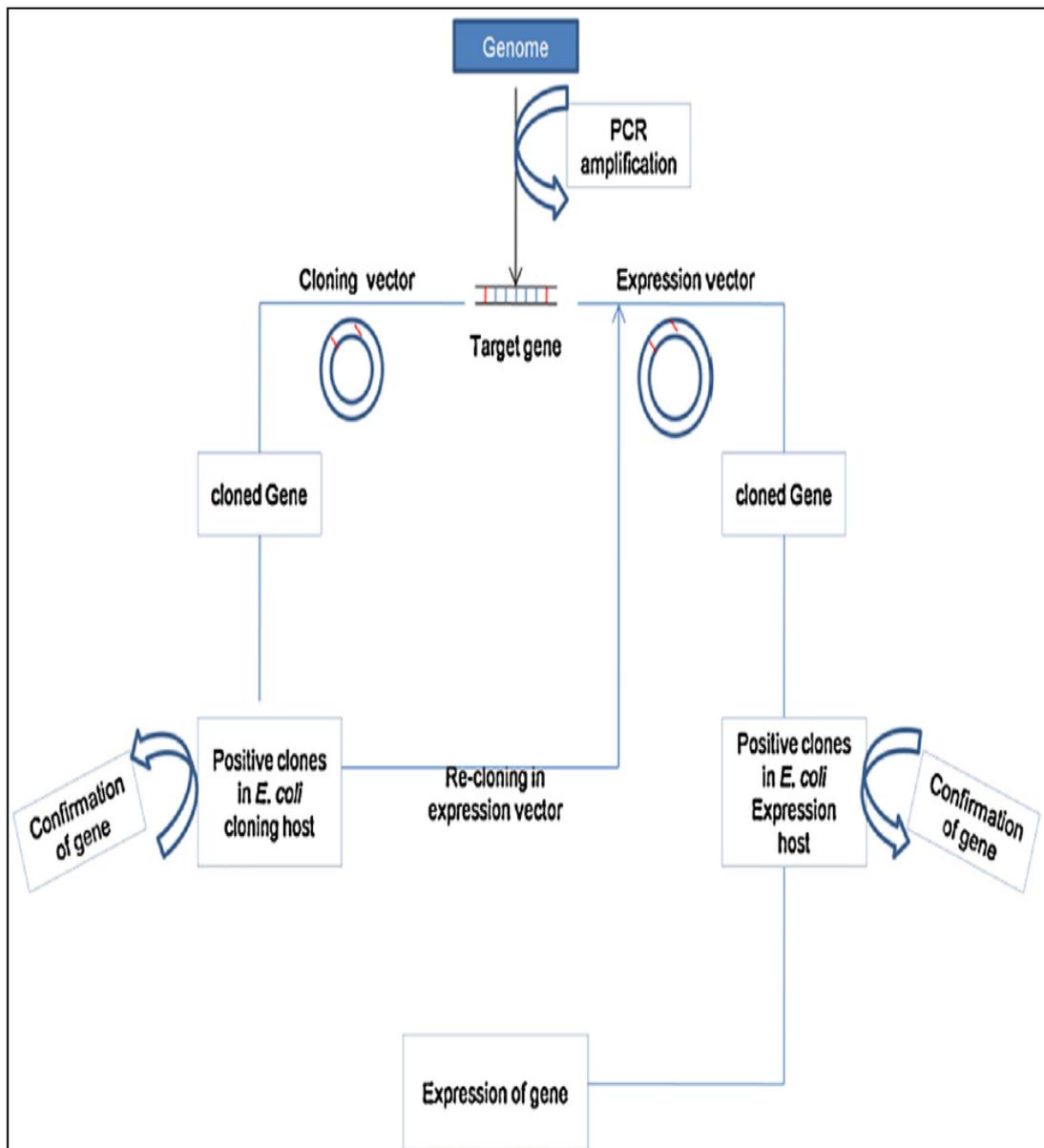


Figura 6: Representación esquemática de la expresión heteróloga de un gen de interés en *E. coli*.
FUENTE: Adaptado de “Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*” por Schumann, W., & Ferreira, L. C. S. (2004). *Genetics and Molecular Biology*, 27(3), 442 – 453.

2.3.4. Electroforesis

2.3.4.1. Electroforesis de ADN

La electroforesis en gel de agarosa es la forma más efectiva de separar fragmentos de ADN de diferentes tamaños. La agarosa se aísla de los géneros de algas *Gelidium* y *Gracilaria*, y consiste en subunidades repetidas de agarobiosa (L y D – galactosa). Durante la gelificación, los polímeros de agarosa se asocian de manera no covalente y forman una red de haces cuyos tamaños de poro determinan las propiedades de tamizado molecular del gel (Lee et al., 2012).

Para separar el ADN usando electroforesis en gel de agarosa, el ADN se carga en pocillos prefabricados en el gel y se aplica una corriente. La molécula de ADN (y ARN) está cargada negativamente por la presencia de los grupos fosfatos, por lo tanto, cuando se coloca en un campo eléctrico, los fragmentos de ADN migrarán al ánodo cargado positivamente. Debido a que el ADN tiene una relación masa / carga uniforme, las moléculas de ADN se separarán de acuerdo a sus tamaños dentro del gel de agarosa de manera que la distancia recorrida es inversamente proporcional a su peso molecular; es decir, las moléculas más grandes tendrán mayor dificultad para pasar a través de los poros del gel (incluso pueden bloquearse por completo), mientras que las moléculas más pequeñas estarán relativamente libres de obstáculos y se moverán más rápido (Wilson & Walker, 2009).

La velocidad de migración de una molécula de ADN a través de un gel está determinada principalmente por el tamaño y la conformación del ADN, pero existen ciertos factores que también influyen en la movilidad. Estos pueden ser la concentración de agarosa, el voltaje aplicado y el tipo de tampón de electroforesis usado. Después de la separación, las moléculas de ADN pueden visualizarse bajo luz ultravioleta luego de teñirlas con el tinte apropiado (Lee et al., 2012). La determinación del tamaño del ADN se facilita usando marcadores que poseen un patrón de separación y tamaños de bandas definido.

2.3.4.2. Electroforesis de proteínas

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS – PAGE) es una técnica que implica la separación de proteínas en función de su tamaño o peso molecular. Al calentar la muestra en condiciones desnaturizantes y reductoras, la proteína se despliega y se recubre con moléculas del detergente SDS, adquiriendo una alta carga negativa proporcional a la longitud de la cadena de polipéptidos. Cuando se cargan en una matriz de gel y se colocan en un campo eléctrico, las moléculas de proteína con carga negativa migran hacia el electrodo de carga positiva y se separan por un efecto de tamizado molecular. Después de la visualización mediante una técnica de tinción específica de proteínas, se puede estimar el tamaño de la proteína comparando su distancia de migración, con la de un estándar de peso molecular conocido (Wilson & Walker, 2009).

La adición del detergente SDS es responsable de eliminar las estructuras proteicas secundarias, terciarias y cuaternarias, manteniendo a las proteínas como cadenas lineales de polipéptidos (estructura primaria). Sin embargo, si las proteínas se desnaturizan y se colocan en un campo eléctrico, todas se moverán hacia el polo positivo a la misma velocidad,

sin separación por tamaño. Es por ello que se colocan a las proteínas en poliacrilamida. Este es un polímero de monómeros de acrilamida que permite a las proteínas de diversos tamaños moverse a diferentes velocidades. Un gel de poliacrilamida no es sólido, pero está hecho de un laberinto de túneles que serpentean a través del gel y no van en línea recta. Las proteínas pequeñas se mueven más rápido debido a que tienen mayor acceso a los túneles que las proteínas de mayor tamaño (Roy & Kumar, 2014).

El sistema de gel más utilizado para separar una amplia gama de proteínas mediante SDS – PAGE utiliza geles de tris – glicina denominados gel de apilamiento y gel de resolución. El gel de apilamiento tiene un tamaño de poro muy grande (4% de acrilamida) que permite a todas las proteínas de la muestra moverse libremente para concentrarse en bandas muy estrechas (bajo el efecto del campo eléctrico) y entrar al gel de resolución al mismo tiempo. En cambio, el gel de resolución (donde se utilizan porcentajes de gel de acrilamida variables) separa a las proteínas en función de su peso en masa. Este sistema clásico utiliza un sistema de tampón discontinuo donde el pH y la fuerza iónica del tampón utilizado para hacer funcionar el gel (Tris pH 8.3) es diferente de los tampones utilizados en el gel de apilamiento (Tris, pH 6.8) y el gel de resolución (Tris, pH 8.8) (Roy & Kumar, 2014).

2.4. Cromatografía de proteínas

2.4.1. Aspectos generales

La cromatografía es un conjunto de técnicas que permite la separación, identificación y purificación de proteínas. Es posible purificar proteínas en función de sus características tales como el tamaño, la carga electrostática, los grupos hidrofóbicos presentes en la superficie y la capacidad de interacción con la fase estacionaria (Coskun, 2016).

Los diversos métodos para separar proteínas incluyen la cromatografía en columna, cromatografía en capa fina, cromatografía en papel, cromatografía de gases, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de permeación en gel o exclusión molecular, cromatografía líquida de alta presión y cromatografía de afinidad (Harwood & Moody, 1990)

2.4.2. Cromatografía de exclusión molecular

El método que se usó principalmente en esta investigación fue la cromatografía de exclusión molecular. El principio básico de esta técnica es utilizar como fase estacionaria polímeros con poros de diferentes tamaños (p.ej. polisacáridos complejos como los dextranos) para separar las macromoléculas según el tamaño molecular (Figura 7) (Coskun, 2016). La

solución que contiene moléculas de diferentes dimensiones se pasa continuamente con un flujo constante a través de una columna. Las moléculas más grandes que los poros no pueden penetrar en los dextranos, moviéndose así más rápido dentro de la columna a través de los espacios existentes entre las partículas porosas. En cambio, las moléculas más pequeñas que los poros se difunden en ellos y salen de la columna mucho después que las moléculas grandes. El tiempo que las moléculas se toman desde entrar hasta salir de la columna se denomina tiempo de retención (Ó'Fágáin et al., 2011).

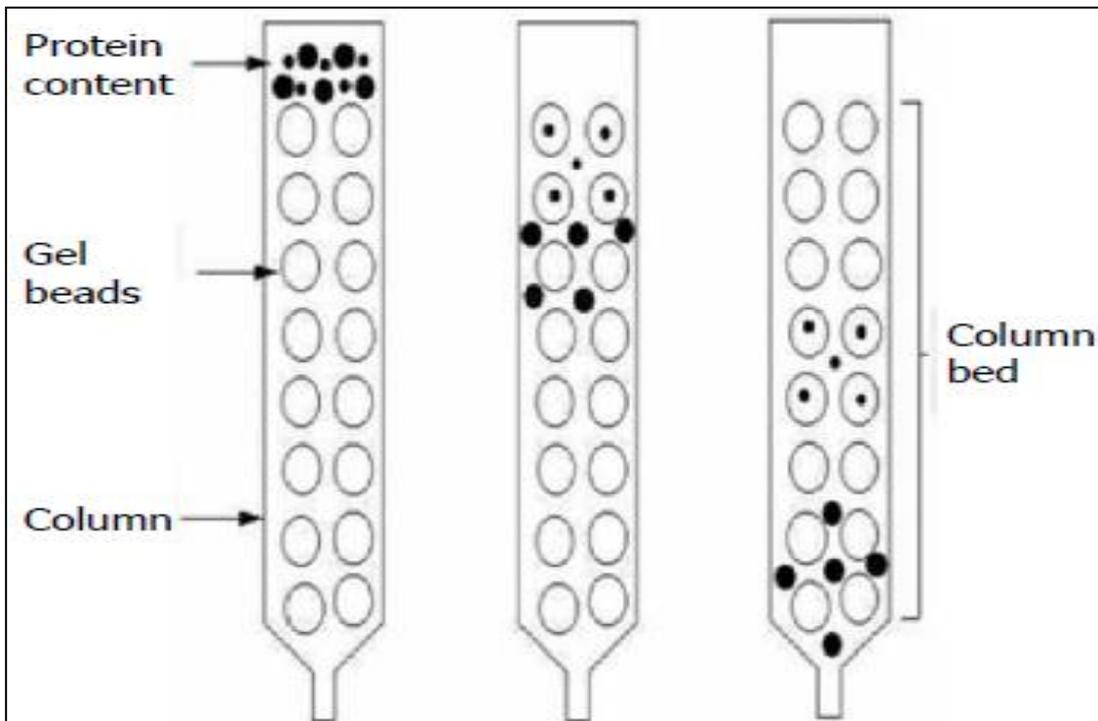


Figura 7: Cromatografía de exclusión molecular o permeación en gel.

FUENTE: Adaptado de "Separation techniques: Chromatography" por Coskun, O. (2016). *Northern Clinics of Istanbul*, 3(2), 156-160.

2.4.3. Cromatografía multimodal

Otra técnica que también fue necesaria para la purificación de proteínas encapsulinas fue la cromatografía multimodal o de modo mixto. Este método posee una alta selectividad y retención de una variedad de compuestos, especialmente moléculas polares y cargadas (K. Zhang & Liu, 2016). Los solutos de la muestra interactúan con la fase estacionaria a través de más de un modo o mecanismo de interacción a la vez, en una sola columna (Figura 8) (Liu et al., 2019).

Las resinas (fase estacionaria) de la cromatografía de modo mixto se han utilizado para la purificación de una gran variedad de moléculas diana, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, hormonas, enzimas y virus. Generalmente, están involucradas en diferentes

etapas de los procesos de purificación cromatográfica, desde la captura hasta el pulido. Se usan con mayor frecuencia cuando las resinas que poseen solo un único modo de acción no han logrado entregar los resultados deseados o no lo han hecho a un costo razonable (Brekkan, 2018).

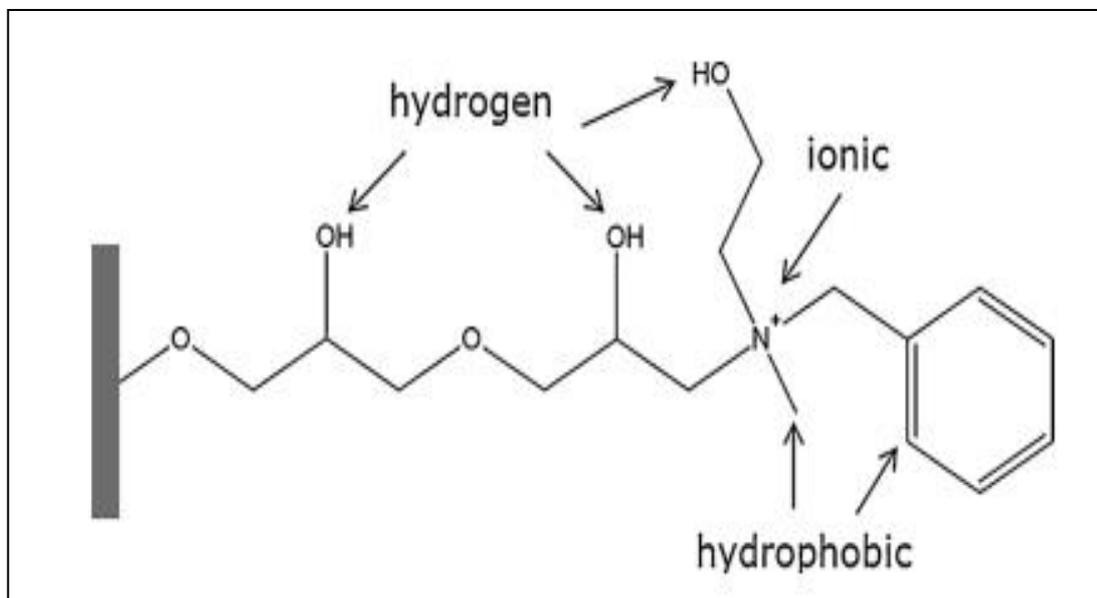


Figura 8: Posibilidades de grupos químicos del ligando de una resina en la cromatografía multimodal. Pueden coexistir interacciones iónicas o electrostáticas, hidrofóbicas e hidrofílicas.

FUENTE: Adaptado de “Advance chromatin extraction improves the performance of electropositive mixed – mode chromatography as a capture step and enables its integration with void – exclusion anion Exchange chromatography as a two column step purification platform for monoclonal antibody production” por Liu, W., Sun, Y., Yu, J., Chen, Q., Bao, Z., Fan, X., Liang, Y., Peng, X., Xian, M., & Nian, R. (2019). *Biochemical Engineering Journal*, 142, 145 – 152.

2.5. Caracterización de proteínas

2.5.1. Aspectos generales

La caracterización de proteínas requiere el uso de varias técnicas. Por ejemplo, algunos métodos evalúan la pureza y estabilidad de las proteínas; y otros, los aspectos estructurales: tamaño, forma y cambios conformacionales. Estos últimos son importantes para detectar posibles modificaciones de las estructuras terciarias producidas en la proteína durante la preparación, manipulación y almacenamiento (Oliva et al., 1997).

La caracterización es una tarea relativamente compleja. Primero, es necesario evaluar la estabilidad y pureza de la proteína utilizando métodos analíticos como la cromatografía y la electroforesis. Luego, se usan varias técnicas para determinar la composición de aminoácidos y su secuencia (es decir, la estructura primaria). También se puede utilizar otros métodos para determinar el tamaño y la conformación. Algunos de ellos son el dicroísmo

circular, resonancia magnética nuclear, difracción de rayos X, microscopía electrónica y dispersión de luz (Oliva et al., 1997).

2.5.2. Dispersión de luz dinámica

En esta investigación se realizó una caracterización inicial usando la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS). Este método proporciona información relacionada al diámetro de las partículas presentes en una muestra. Típicamente, en los experimentos de dispersión de luz, un haz monocromático se dirige a la muestra y luego un detector registra la luz dispersada en cierto ángulo (Figura 9). En la DLS, las fluctuaciones de intensidad de luz se miden constantemente a través del tiempo, y debido a que las partículas que reflejan la luz y causan su dispersión están sujetas a un movimiento browniano, se puede inferir el coeficiente de difusión a partir de los cambios de la dispersión en el tiempo. El coeficiente de difusión (D) se relaciona con el radio hidrodinámico (R_h) de la partícula a través de la ecuación de Stokes – Einstein (Ecuación 1) (Carvalho et al., 2018).

Ec. 1.

$$D = \frac{k_b T}{6\pi \eta R_h}$$

Donde:

D = Coeficiente de difusión

T = Temperatura absoluta

K_b = Constante de Boltzmann ($1.38 \times 10^{-23} \text{ kg.m}^2.\text{s}^{-2}.\text{K}^{-1}$)

n = Viscosidad del medio

R_h = Radio hidrodinámico del soluto

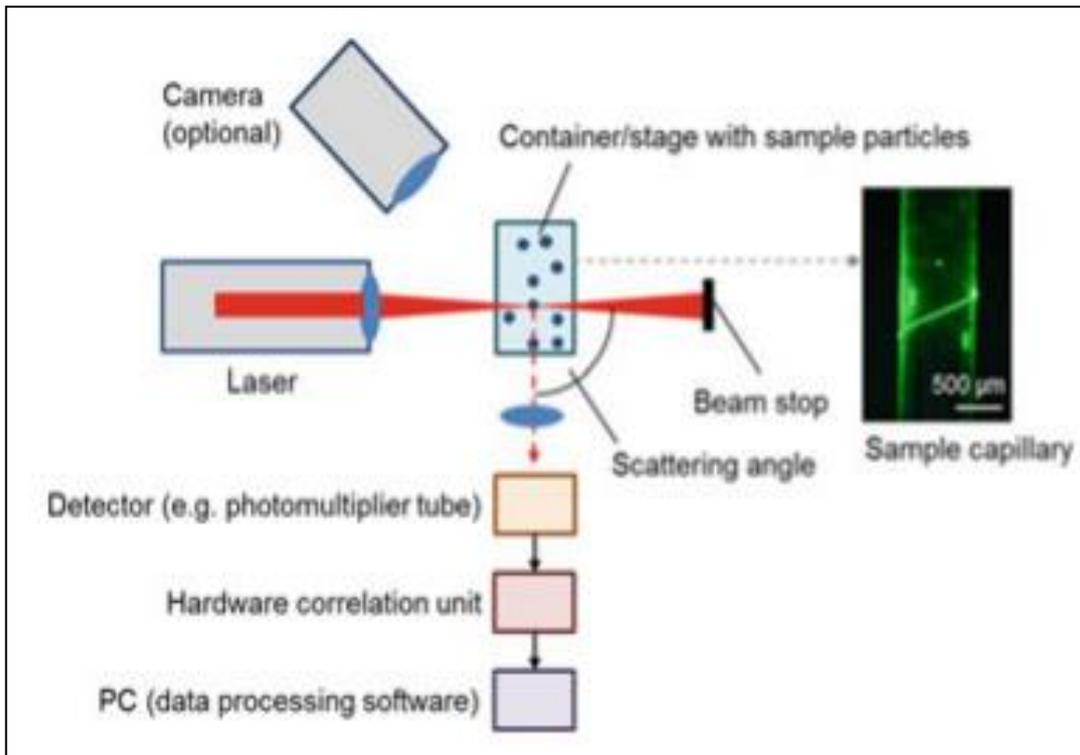


Figura 9: Fundamento del método de dispersión de luz dinámica (DLS). Las fluctuaciones de la dispersión de luz, debido al movimiento browniano individual de las nanopartículas en una solución, se utilizan para determinar la distribución del tamaño de partícula (diámetro) en tiempo real.

FUENTE: Adaptado de “Application of Light Scattering Techniques to Nanoparticle Characterization and Development” por Carvalho, P.M.; Felício, M.R.; Santos, N.C.; Gonçalves, S. & Domingues, M. M. (2018). *Frontiers in Chemistry*, 6, 237. pp. 125-170.

III. METODOLOGÍA

3.1. Material biológico y plásmidos

- Plásmido de clonación “Encap_eGFP_opti_Samira_pUC57”: Este vector fue diseñado y contiene la secuencia del gen de capsulina de *T. maritima*. Su síntesis fue realizada por la empresa GenScript.
- Plásmido de expresión “pET – Duet”: Este vector comercial posee un promotor “T7” controlado bajo el sistema de inducción por IPTG.
- Cepas modificadas de *E. coli*:
 - a) Cepa “NEB Stable”: Utilizada para la producción de los plásmidos.
 - b) Cepa “BLR (DE3)”: Utilizada para la producción de las proteínas capsulinas. Contiene el gen de ARN polimerasa proveniente del bacteriófago T7 expresado bajo el control de un promotor que es regulado por el represor “Lac”.

3.2. Material de laboratorio e insumos

- Asa de Kolle
- Bolsas de tips (10 µL, 100 µL, 1000 µL)
- Bolsas de tubos “Corning” (15 mL, 50 mL)
- Bolsas de tubos de microcentrífuga “Eppendorf”
- Botellas de alcohol 96°
- Botellas de vidrio (100 mL, 500 mL, 1000 mL)
- Caja de filtros de 0.20 µm
- Caja de filtros de 0.45 µm
- Caja de guantes
- Cebadores universales “T7”

- Columna cromatográfica de exclusión molecular “HiLoad 26/600”
- Columna cromatográfica multimodal “HiScreen CaptoCore 700”
- Enzimas de biología molecular (“NcoI”, “NdeI”, ligasa, “Supernucleasas”)
- Frascos de centrifuga
- Frascos de reactivos bioquímicos
- Kit de extracción de plásmidos
- Kit de purificación de ADN
- Matraces de 250 mL
- Matraces de 50 mL
- Matraces Kitasato 1000 mL
- Paquetes de papel filtro Whatman 0.22 μm
- Placas Petri
- Rollos de papel aluminio
- Rollos de papel toalla
- Rollos de parafilm
- Tubos concentradores “Amicon Ultra – 15 mL (10K)”

3.3. Equipos de laboratorio

- Agitador y calentador magnético
- Autoclave
- Balanza analítica
- Cámara de flujo laminar
- Balanza analítica
- Cámara de flujo laminar
- Cámara de siembra
- Centrifuga “Sorvall”
- Congeladora -20°C

- Congeladora -70°C
- Equipo DLS modelo “Brookhaven 90Plus”
- Equipo purificador de proteínas “FPLC Akta Explorer”
- Estufa
- Incubadora
- Incubadora agitadora refrigerada
- Lector de microplacas multimodo “Tecan”
- Microcentrífuga
- Micropipetas
- Microscopio electrónico de barrido de alto y bajo vacío modelo “JEOL – IT300 30 Kv”
- Potenciómetro
- Sonicador “Sonic Ruptor 400”
- Vórtex

3.4. Métodos

3.4.1. Diseño del plásmido contenedor de la secuencia codificadora del gen de encapsulina de *T. maritima*

Se diseñó el plásmido “Encap_eGFP_opti_Samira_pUC57” (Anexo 1) usando los programas de computadora “A plasmid editor (ApE)” y “SnapGene Viewer”. Luego, fue ordenado a sintetizarse a la empresa “GenScript”. El plásmido además de poseer la secuencia de un vector de clonación (pUC57), contiene tanto el gen que codifica a la proteína encapsulina de *T. maritima*, así como otras secuencias (“eGFP” y “Ferritina_tag”) que se usarán para procedimientos posteriores no involucrados con esta tesis. Los sitios de restricción añadidos por conveniencia en los extremos del gen de encapsulina fueron “NcoI” y “NdeI”.

3.4.2. Resuspensión, transformación y extracción del plásmido “Encap_eGFP_opti_Samira_pUC57”

Con la llegada del plásmido al laboratorio, se procedió a resuspender según las instrucciones sugeridas en la página web de “GenScript”. Se tomó 1uL de la resuspensión para transformar

el plásmido en la cepa de *E. coli* “NEB Stable” siguiendo el protocolo de alta eficiencia de transformación disponible en la página de NEB (“New England Biolabs”). El resto de plásmido resuspendido fue almacenado a -20°C . Después, se picaron colonias de la placa de bacterias transformantes y se sembraron en 10 mL de medio Luria – Bertani (LB) con Ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 16 horas a 37°C y 250 RPM. Luego, se extrajo el plásmido siguiendo el manual del kit “innuPREP Plasmid Mini Kit 2.0” disponible también en la página web de la marca (Analytik Jena). Para poder comprobar la identidad del plásmido, se realizaron digestiones con las enzimas de restricción “NcoI” y “NdeI”. La visualización de los fragmentos obtenidos en la electroforesis verificó el plásmido esperado. Una vez confirmada la identidad, todo el plásmido extraído se conservó a -20°C , se volvió a picar una colonia de la placa anterior y se sembró en 10 mL de medio LB más Ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 16 horas a 37°C y 250 RPM con el fin de preparar un stock de glicerol al 25% (v/v) para su almacenamiento a largo plazo a -70°C .

3.4.3. Obtención del inserto para la ligación a partir del plásmido

“Encap_eGFP_opti_Samira_pUC57”

Al plásmido extraído anteriormente, se le realizó una doble digestión con las enzimas de restricción “NcoI” y “NdeI” para obtener fragmentos diferenciables a simple vista en un gel de electroforesis. Luego, se utilizó el kit “GeneJET Gel Extraction Kit” para purificar el fragmento que contiene al gen de la capsulina (inserto) a partir del gel agarosa usado. Para ello, se siguió las instrucciones del manual disponible en la página web de la marca del kit (“Thermo Fisher Scientific”). Una vez obtenido el inserto, se determinó la concentración de ADN utilizando el lector de microplacas multimodal (Tecan) y se conservó a -20°C hasta ser usado para la ligación.

3.4.4. Transformación y extracción del plásmido “pET_Duet”

El plásmido “pET_Duet” (Anexo 2) se encontraba disponible en el laboratorio ya resuspendido y conservado a -20°C . Para transformarlo en la cepa de *Escherichia coli* “NEB® Stable Competen”, se tomó 1 μL de la resuspensión y se siguió el protocolo de alta eficiencia de transformación. El resto del plásmido resuspendido se volvió a conservar a -20°C . Luego, se siguió el mismo procedimiento de extracción e identificación del plásmido “Encap_eGFP_opti_Samira_pUC57”.

3.4.5. Obtención del vector de expresión para la ligación a partir del plásmido “pET_Duet”

Al plásmido extraído anteriormente, se le realizó una triple digestión con las enzimas de restricción “NcoI”, “NdeI” y “BamHI”. Luego, se utilizó el kit “GeneJET Gel Extraction Kit” para obtener el fragmento de interés puro (vector de expresión) y la concentración de ADN fue determinada utilizando el lector de microplacas multimodal (“Tecan”). Se conservó a -20°C hasta ser usado para la ligación. Es importante mencionar que en este procedimiento no se realizó la purificación a partir de un gel de agarosa, sino que se usó el kit para eliminar los fragmentos cortos de ADN que se produjeron en la digestión con el fin de obtener el vector de expresión en estado muy puro.

3.4.6. Obtención mediante ligación, transformación y extracción del plásmido “pET_Duet_Encap”

La ligación entre el inserto y el vector de expresión se realizó usando la enzima ligasa “T4 DNA Ligase 5U/ μL ” de la marca “Thermo Fisher Scientific” (el protocolo se encuentra en la misma página web). Las ratios utilizadas fueron 3:1 y 5:1. Posteriormente, los productos de la ligación se transformaron en la cepa “NEB Stable”. Todas las colonias obtenidas en las placas fueron sometidas a un PCR para comprobar la incorporación del nuevo plásmido producto de la ligación, al cual se le denominó “pET_Duet_Encap” (Anexo 3). Luego, se extrajo el plásmido de dos de las colonias transformantes confirmadas (una de cada ratio) y adicionalmente, se transformó en la cepa “NEB Stable” para así conseguir más cantidad del mismo. Por otro lado, también se preparó un stock de glicerol al 25% (v/v) para su almacenamiento a largo plazo a -70°C . Todo el plásmido “pET_Duet_Encap” obtenido fue conservado -20°C hasta ser usado para la expresión.

3.4.7. Expresión de proteínas encapsulina a partir del plásmido “pET_Duet_Encap”

El plásmido “pET_Duet_Encap” fue transformado en la cepa “BLR (DE3)” para la expresión de proteínas encapsulinas. Antes de trabajar con grandes volúmenes, primero se tuvo que comprobar la correcta expresión del gen encapsulina utilizando volúmenes pequeños de cultivo. Además, también se confirmó que el sistema de expresión funciona solamente bajo la inducción por Isopropil Tiogalactósido (IPTG). Para ello, se picó una colonia de la placa de bacterias transformantes “BLR (DE3)” y se sembró en 10 mL de medio de LB con Ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 16 horas a 37°C y 250 RPM. Luego, se tomaron 100 μL de ese cultivo y se inoculó (por cada matraz) en 6 matraces de 250 mL con 50 mL de medio LB más Ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Estos cultivos se dejaron creciendo a 37°C y 250 RPM hasta

alcanzar un O.D (600 nm) entre los valores de 0.6 y 0.8. Una vez obtenido el valor de O.D. esperado, se añadió IPTG (0.1 mM) a tres matraces, dejando los restantes como control negativo. La inducción fue realizada a tres temperaturas distintas (18°C, 25 °C y 37°C) por 16 horas y a 250 RPM, distribuyendo dos matraces (uno con IPTG y otro el control negativo) para cada temperatura. Después, el contenido de cada matraz se vertió en tubos de polipropileno “Corning” de 50 mL estériles para ser centrifugados a 4°C durante 15 minutos a 8000 RPM en el equipo “SORVALL”. Se descartaron los sobrenadantes y cada pellet obtenido fue resuspendido con 700 µL de buffer fosfato salino (PBS) en pequeños tubos “Eppendorf” de 2 mL. Luego, se realizó una lisis agregando “beads” en relación 1:1 con el volumen de resuspensión obtenido. La agitación mecánica para lograr la interacción entre los “beads” con la muestra resuspendida fue otorgada por un vórtex durante 10 minutos. Posteriormente, el lisado fue centrifugado a 4°C durante 30 minutos a 13500 RPM en una microcentrífuga. Las fracciones solubles fueron analizadas mediante SDS – PAGE y de esta manera, se verificó el sistema de expresión de proteínas encapsulinas. En consecuencia, se preparó un stock de glicerol al 25% (v/v) de la colonia picada para su almacenamiento a largo plazo a –70°C.

Una vez que se comprobó la correcta expresión de las encapsulinas, se realizó el trabajo con mayores volúmenes de cultivo. Para ello, se picó una colonia a partir de una de placa de bacterias transformantes “BLR (DE3)” del plásmido “pET_Duet_Encap” y se sembró en 10 mL de medio de LB con Ampicilina (100 µg/mL) durante 16 horas a 37°C y 250 RPM. Luego, se tomaron 2 mL de ese cultivo y se inoculó (por cada matraz) en 4 matraces de 1000 mL con 250 mL de medio LB más Ampicilina (100 µg/mL). Estos cultivos se dejaron creciendo a 37°C y 250 RPM hasta alcanzar un O.D. (600 nm) entre los valores de 0.6 y 0.8. Una vez obtenido el valor de O.D. esperado, se añadió IPTG (0.1 mM) a todos los matraces y se realizó la inducción a 18°C por 16 horas y a 250 RPM. Después, el contenido de cada matraz se vertió en frascos limpios para ser centrifugados a 8200 RPM a 4°C durante 25 minutos en el equipo “SORVALL”. Se descartaron los sobrenadantes y la totalidad de pellets obtenidos fue resuspendida con 30 mL de buffer fosfato salino (PBS) en un pequeño vaso de precipitado de 100 mL. Luego, se realizó una lisis mediante sonicación en el equipo “SONIC RUPTOR 400” durante 15 minutos (30 segundos de pulso por cada minuto). Posteriormente, se realizó una clarificación añadiendo la enzima “Supernucleasa” al lisado e incubándose a 25°C en agitación constante durante una hora. Después, el lisado clarificado fue centrifugado a 4°C durante 30 minutos a 10600 RPM en el equipo “SORVALL”. Se

descartó la fracción insoluble y el producto soluble fue tratado con filtros de membrana (0.22 μm). Un pequeño volumen del filtrado fue conservado a 4°C para su posterior análisis con SDS – PAGE.

3.4.8. Purificación de proteínas encapsulinas

El filtrado obtenido anteriormente fue purificado en el equipo “FPLC AKTA EXPLORER” con las columnas cromatográficas “HiScreen CaptoCore 700” y “HiLoad 26/600”. Para ello, en primer lugar, se equilibró la columna multimodal “HiScreen CaptoCore 700” con PBS. Una vez equilibrada, el filtrado fue añadido a la columna (a través de bombas) y se recolectaron las fracciones pertenecientes al “Flowthrough”. Una pequeña muestra de cada fracción fue analizada mediante SDS – PAGE con el fin de distinguir a las fracciones que contenían la proteína encapsulina más concentrada. Las fracciones diferenciadas fueron vertidas en un frasco y centrifugadas a 4°C durante 30 minutos a 10600 RPM en el equipo “SORVALL”. Luego, el sobrenadante obtenido fue añadido a la columna de exclusión molecular “HiLoad 26/600” previamente equilibrada con PBS. Se recolectaron todas las fracciones pertenecientes al primer pico y se analizaron con SDS – PAGE. Después de comprobar la pureza de las proteínas encapsulinas en las fracciones, estas se concentraron usando tubos “Amicon Ultra – 15 10K” a 4°C durante 30 minutos a 4500 RPM. Posteriormente, se determinó la concentración de encapsulinas utilizando el reactivo de Bradford y se llevó a 1 mg/mL utilizando PBS y glicerol para ser conservadas a largo plazo a –70°C en microtubos “Eppendorf” de 2 mL.

3.4.9. Caracterización de proteínas encapsulinas mediante la técnica de DLS

Para observar el diámetro esperado de las encapsulinas se utilizó la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS). Para ello, se tomaron muestras de encapsulinas purificadas a partir de un microtubo conservado a –70°C y se prepararon dos diluciones en serie a una concentración de 0.1% y 0.01% (v/v) utilizando PBS y agua ultrapura. Luego, el contenido de cada dilución fue vertido en cubetas de plástico desechables e introducido en el equipo “Brookhaven 90Plus”. El software del equipo se encargó de recopilar, analizar y presentar los datos del diámetro obtenido.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Diseño del plásmido “Encap_eGFP_opti_Samira_pUC57”

Se diseñó una secuencia que contiene el gen de encapsulina de *Thermotoga maritima* (“Encapsulin_opti”), así como otras denominadas “eGFP” y “Ferritina_tag” (Figura 10). El valor del tamaño de la secuencia “Encapsulin_opti” obtenida fue igual a 797 pares de base (pb); el de la secuencia “eGFP”, 714 pb, y el de “Ferritina_tag”, 63 pb. Considerando lo anterior y el tamaño de la secuencia del vector de clonación en el cual fue diseñada (“pUC57”), el tamaño total del plásmido “Encap_eGFP_opti_Samira_pUC57” (Anexo 1) alcanzó un valor igual a 3684 pb.

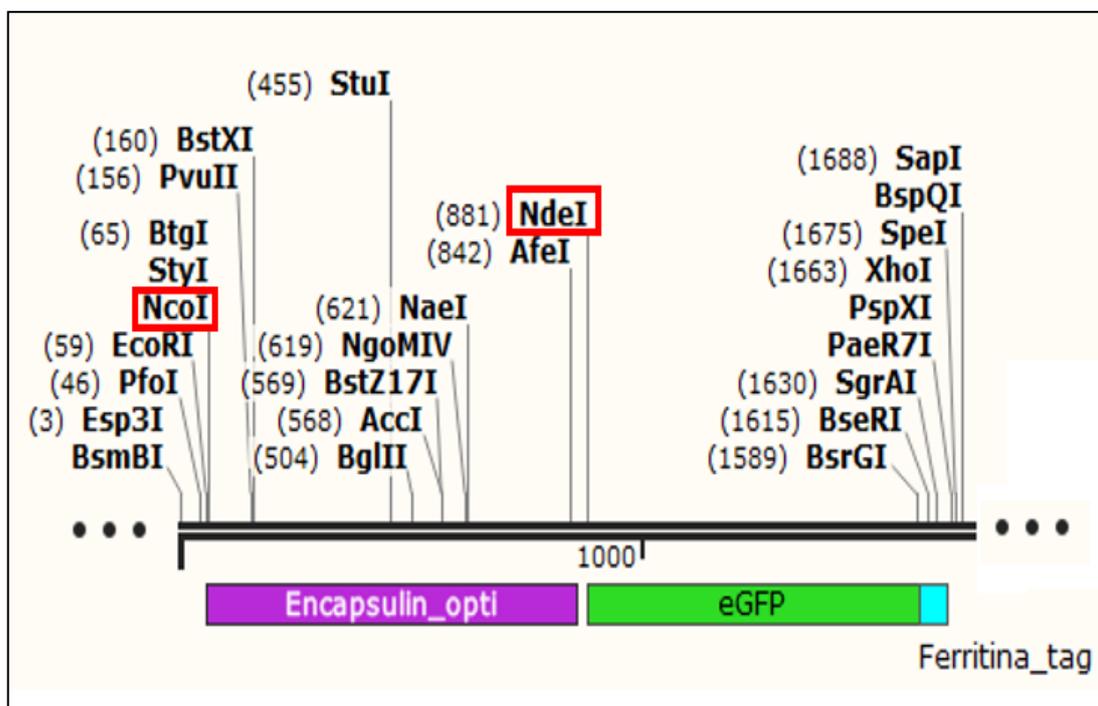


Figura 10: Mapa de la secuencia diseñada que contiene al gen de encapsulina de *T. maritima*. También se observan las secuencias “eGFP” y “Ferritina_tag”. Los sitios de restricción “NcoI” y “NdeI” se ubican en los extremos del gen de encapsulina y están señalados dentro de los rectángulos de marco rojo.

El diseño siguió un modelo de constructos en el cual se demostró que la proteína encapsulina puede ser expresada y purificada de manera óptima, independientemente de una coexpresión

con la proteína fluorescente “eGFP” (Lagoutte et al., 2018). Por otro lado, también se consideró que la secuencia del gen de encapsulina se clonaría en un vector de expresión disponible en el laboratorio (“pET_Duet”). Así pues, se incorporaron los sitios de restricción “NcoI” y “NdeI” en los extremos del gen porque el vector de expresión también los poseía.

4.2. Transformación y extracción del plásmido “Encap_eGFP_opti_Samira_pUC57” para la obtención del inserto usado en la ligación

Se obtuvieron dos placas en el proceso de transformar el plásmido “Encap_eGFP_opti_Samira_pUC57” en la cepa “NEB Stable”. Una de ellas contenía bacterias transformantes del plásmido y la otra fue el control negativo, es decir, bacterias a las cuales no se les realizó la transformación (Figura 11).

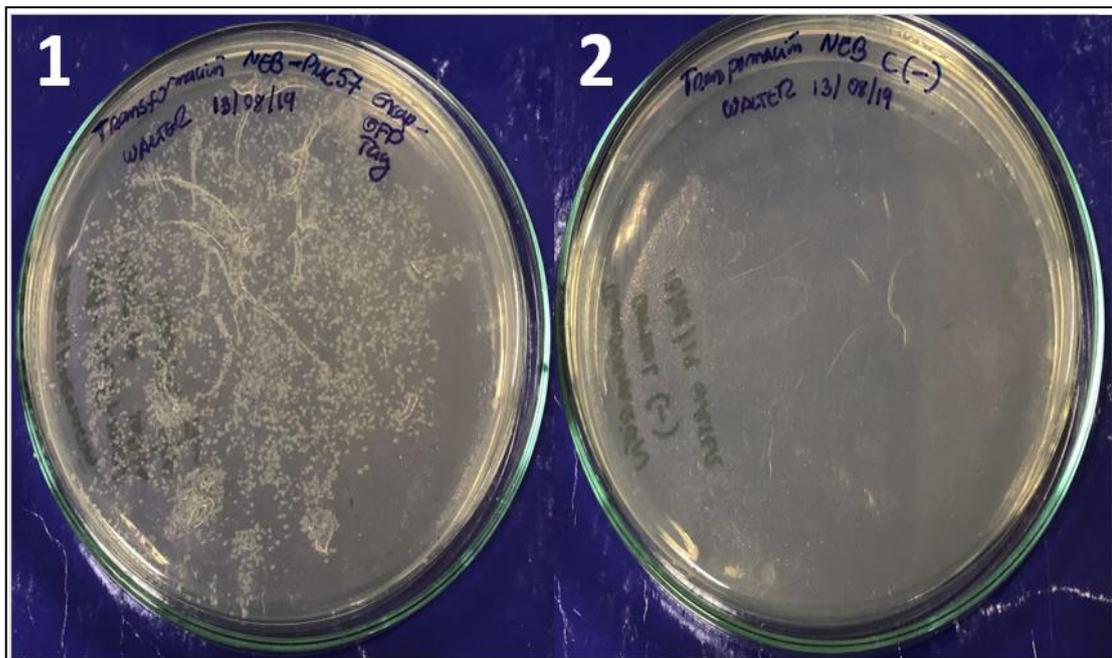


Figura 11: Placas obtenidas en el proceso de la transformación del plásmido “Encap_eGFP_opti_Samira_pUC57”. **1)** Placa con las bacterias transformantes del plásmido. **2)** Placa del control negativo de transformación (no se observan colonias).

Para comprobar lo anterior, se extrajo plásmido a partir de la placa de bacterias transformantes y se digirió usando las enzimas “NcoI” y “NdeI”. Posteriormente, se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (Figura 12) usando el marcador “GeneRuler 1 Kb” de la marca “Thermo Fisher Scientific”. El valor del tamaño obtenido fue igual a 3684 pb para ambas digestiones (según el mapa del plásmido disponible en el Anexo 1).

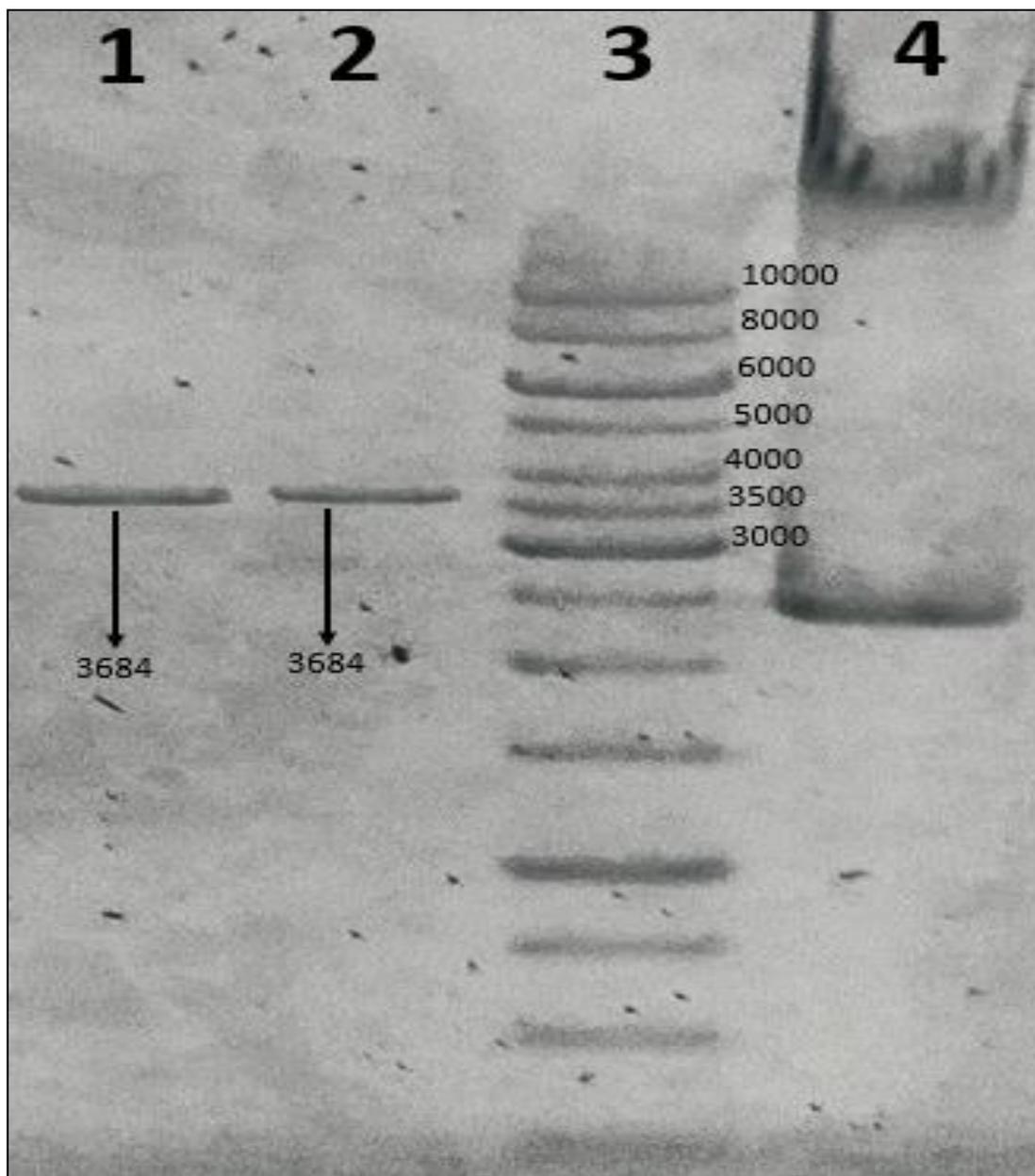


Figura 12: Gel de electroforesis para comprobar la identidad del plásmido “Encap_eGFP_opti_Samira_pUC57”. 1) Plásmido digerido con la enzima “NcoI”. 2) Plásmido digerido con la enzima “NdeI”. 3) Marcador. 4) Plásmido no digerido. Los valores de los tamaños obtenidos fueron los esperados.

Luego de haber confirmado la identidad del plásmido, se le hizo una doble digestión usando las enzimas anteriores y lo obtenido fue observado mediante electroforesis. La banda de interés (inserto) fue purificada a partir del gel de agarosa utilizado y la concentración de ADN obtenida resultó igual a 17.6 ng/μL. El inserto se corrió en un gel de electroforesis para comprobar su identidad y pureza (Figura 18). El tamaño obtenido tuvo un valor igual a 816 pb.

La purificación o recuperación de fragmentos de ADN a partir de gel de agarosa es uno de los procedimientos más comunes para aplicaciones posteriores, tales como digestión,

ligación y clonación (Sun et al., 2012). En la obtención del inserto que contiene el gen de encapsulina, el uso de dicho procedimiento se vio favorecido debido a que existía una gran diferencia observable de tamaños entre los fragmentos producidos en la doble digestión del plásmido “Encap_eGFP_opti_Samira_pUC57”. Además, se usó un reactivo de tinción de ADN alternativo no mutagénico para evitar cualquier posibilidad de alteración en la secuencia del inserto, ya que se ha demostrado que los efectos del bromuro de etidio y la alta energía de la luz ultravioleta de onda corta, aparte de ser perjudiciales para los usuarios, pueden dañar las cadenas de ADN (Motohashi, 2019).

Por otro lado, si fuese necesario secuenciar la muestra del inserto extraída a partir del gel de agarosa, este procedimiento sería un inconveniente ya que incluye un bajo rendimiento y alto costo. En ese caso, se recomienda el uso de otras técnicas o modificaciones de las mismas que ahorrarían mucho tiempo y con las que se obtendrían una gran cantidad y pureza del ADN recuperado (Abraham et al., 2017).

4.3. Transformación y extracción del plásmido “pET_Duet” para la obtención del vector de expresión usado en la ligación

Se obtuvieron dos placas en el proceso de transformar el plásmido “pET_Duet” en la cepa “NEB Stable”. Una de ellas contenía bacterias transformantes del plásmido y la otra fue el control negativo, es decir, bacterias a las cuales no se les realizó la transformación (Figura 13).

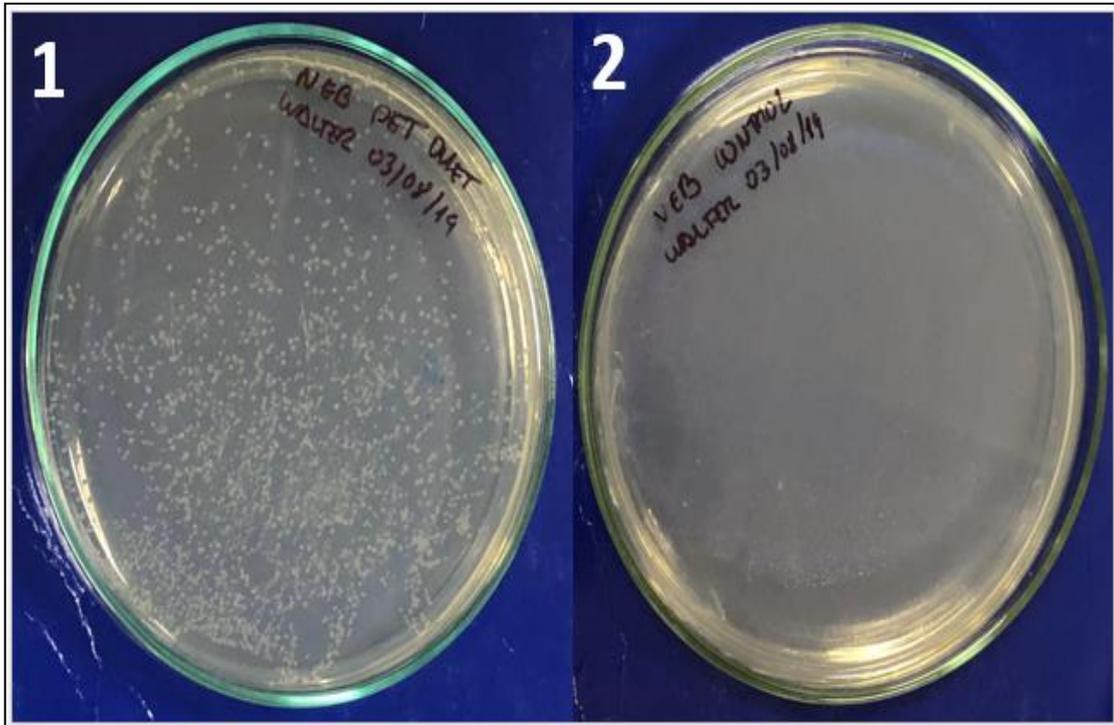


Figura 13: Placas obtenidas en el proceso de la transformación del plásmido “pET_Duet”. 1) Placa con las bacterias transformantes del plásmido. 2) Placa del control negativo de la transformación (no se observan colonias).

Para comprobar lo anterior, se extrajo plásmido a partir de la placa de bacterias transformantes y se digirió usando las enzimas “NcoI” y “NdeI”. Posteriormente, se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (Figura 14) usando el marcador “GeneRuler 1 Kb”. Los tamaños obtenidos fueron igual a 5420 pb para ambas digestiones (según el mapa del plásmido disponible en el Anexo 2).

Luego de haber confirmado la identidad del plásmido, se le hizo una triple digestión usando las enzimas anteriores más “BamHI” y lo obtenido fue purificado para conseguir el fragmento de interés (vector de expresión). Después, se calculó la concentración de ADN y resultó igual a 24.3 ng/μL. El vector se corrió en un gel de electroforesis para comprobar su identidad y pureza (Figura 19). El tamaño obtenido tuvo un valor igual a 5191 pb.



Figura 14: Gel de electroforesis para comprobar la identidad del plásmido “pET_Duet”. 1) Plásmido no digerido. 2) Marcador. 3) Plásmido digerido con la enzima “NcoI”. 4) Plásmido digerido con la enzima “NdeI”. Los valores de los tamaños obtenidos fueron los esperados.

La falta de diferencias observables entre los tamaños del plásmido “pET_Duet” no digerido y el vector de expresión en un gel de electroforesis, fue el motivo por el cual no se realizó la extracción de ADN a partir de gel. De este modo, el hacer una triple digestión al plásmido “pET_Duet”, en donde la enzima de restricción “BamHI” cortaba únicamente al fragmento de no interés producido por las enzimas “NdeI” y “NcoI”, funcionó como alternativa para purificar el vector de expresión a través de los reactivos y columnas de sílice del mismo kit usado para obtener el inserto.

Lo anterior fue posible debido a que el valor del tamaño de los segmentos producidos por la enzima “BamHI” no superaba los 500 pb, disminuyendo la eficiencia de la unión de estos a la membrana de sílice y favoreciendo la adsorción exclusiva del vector de expresión. El fundamento de la tecnología basada en columnas con membranas de sílice de la mayoría de kits de extracción de ADN a partir de gel, viene determinado en primer lugar por el uso de un buffer con propiedades que promueven la adsorción de los ácidos nucleicos en la superficie de dichas membranas. Luego, las impurezas se eliminan mediante un paso de lavado y el ADN adsorbido se eluye de la columna con otro buffer, permitiendo así su uso en aplicaciones posteriores (Katevatis et al., 2017).

4.4. Obtención mediante ligación, transformación y extracción del plásmido “pET_Duet_Encap”

Tras haber ligado el inserto con el vector de expresión, el nuevo plásmido obtenido fue transformado en la cepa “NEB Stable” y se obtuvieron 4 placas. Una de ellas contenía bacterias transformantes del plásmido utilizando la ratio 3:1 en la ligación, y otra, la ratio 5:1. Las placas restantes fueron los controles de transformación y ligación (Figura 15).

Con el fin de comprobar que las bacterias fueron transformantes para el plásmido “pET_Duet_Encap”, se hizo una PCR a todas las colonias obtenidas en ambas ratios. Para ello, se utilizaron cebadores basados en las secuencias del promotor y terminador “T7”. Posteriormente, los resultados fueron observados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.7% usando el marcador “GeneRuler 100 pb Plus” de la marca “Thermo Fisher Scientific” (Figura 16 y 17). Además, el control positivo de la PCR se realizó utilizando como ADN molde al plásmido “pET_Duet”. El tamaño de la banda amplificada que permitió identificar al plásmido “pET_Duet_Encap” tuvo un valor igual a 1070 pb. Por otro lado, el control positivo también mostró bandas amplificadas esperadas de tamaños igual a 483 y 253 pb.

Luego, se escogieron dos de las colonias confirmadas (una de cada ratio) para extraerles el plásmido y digerirlo con la enzima “NdeI”. Los resultados se observaron en un gel de electroforesis para volver a convalidar su identidad (Figura 18 y 19). El tamaño obtenido fue igual a 6007 pb (según el mapa del plásmido disponible en el Anexo 3).

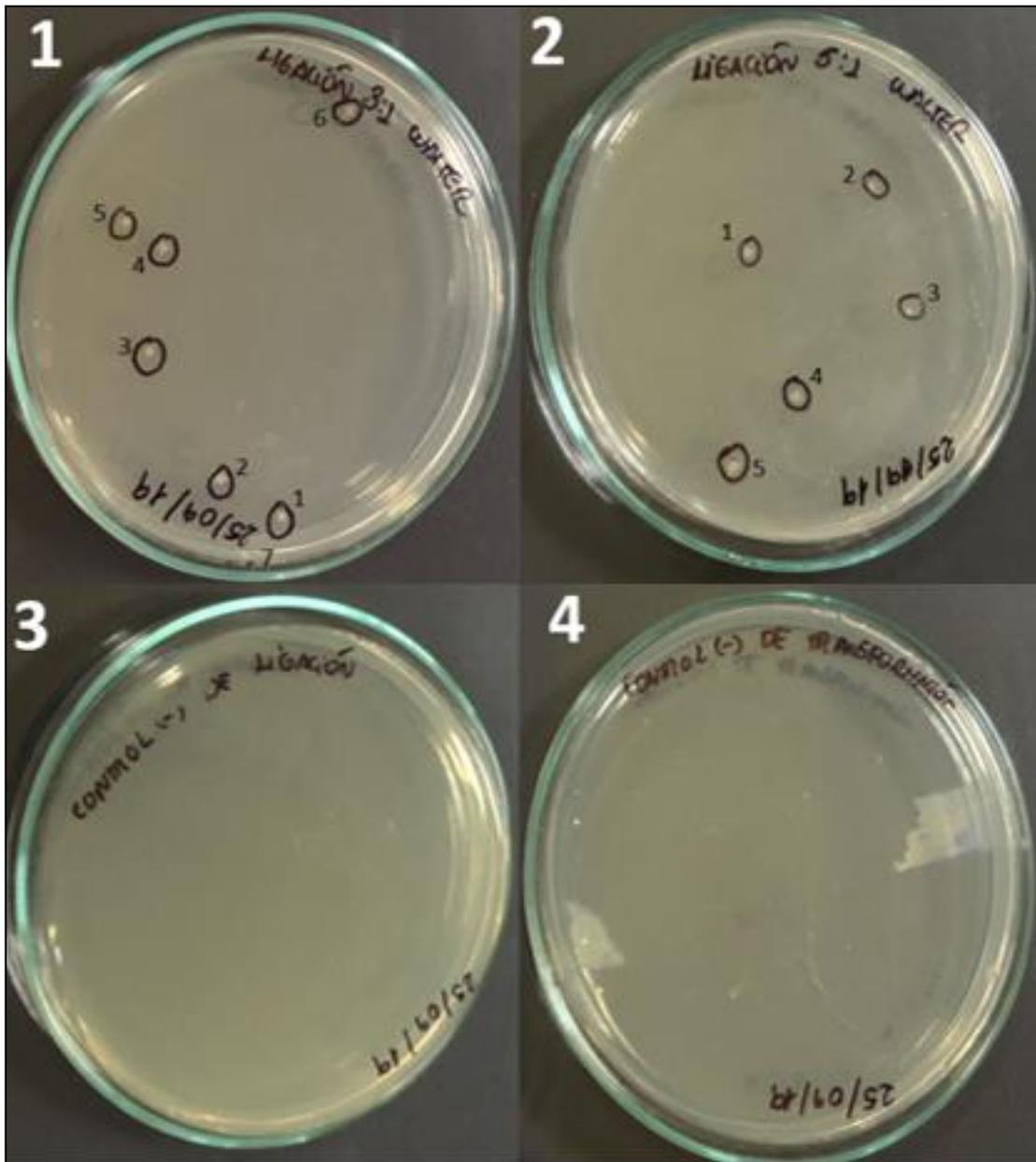


Figura 15: Placas obtenidas en el proceso de la transformación del plásmido producto de la ligación.
1) Placa con bacterias transformantes usando la ratio 3:1 en la ligación (se obtuvieron 7 colonias).
2) Placa con bacterias transformantes usando la ratio 5:1 en la ligación (se obtuvieron 5 colonias).
3) Placa del control negativo de la ligación (no se observan colonias). 4) Placa del control negativo de la transformación (no se observan colonias).

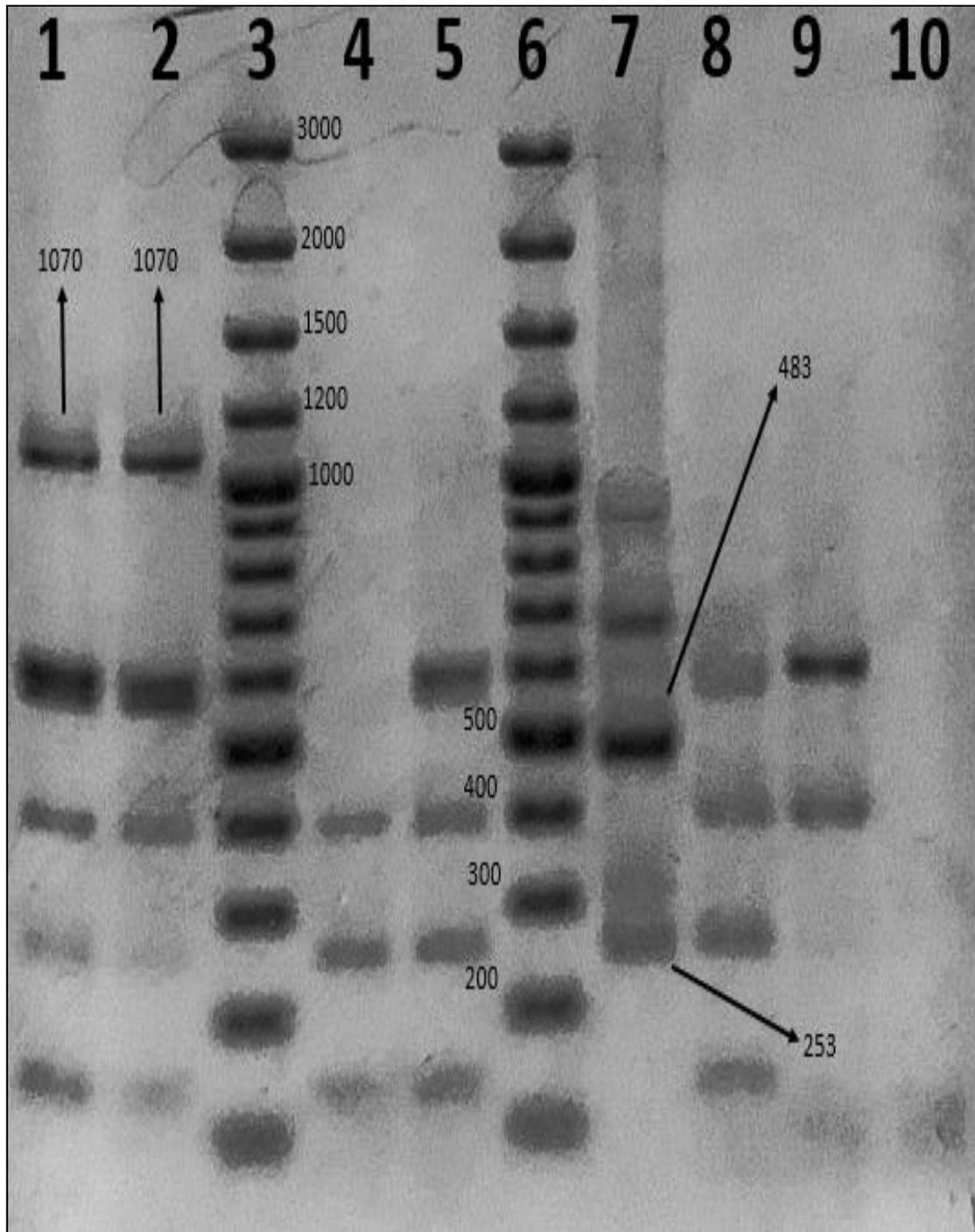


Figura 16: Primer gel de electroforesis obtenido a partir de la PCR de todas las colonias transformantes del plásmido producto de la ligación. Los carriles “1”, “2”, “4”, “5” y “8” corresponden a las colonias de la placa con bacterias transformantes usando la ratio 5:1 asignadas con los números “1”, “2”, “3”, “4” y “5”, respectivamente. Los carriles “3” y “6” corresponden al marcador. El carril “7” corresponde al control positivo de la PCR. El carril “10” corresponde al control negativo de la PCR. El carril “9” corresponde a la colonia de la placa con bacterias transformantes usando la ratio 3:1 asignada con el número “1”. Se observan las bandas amplificadas esperadas.

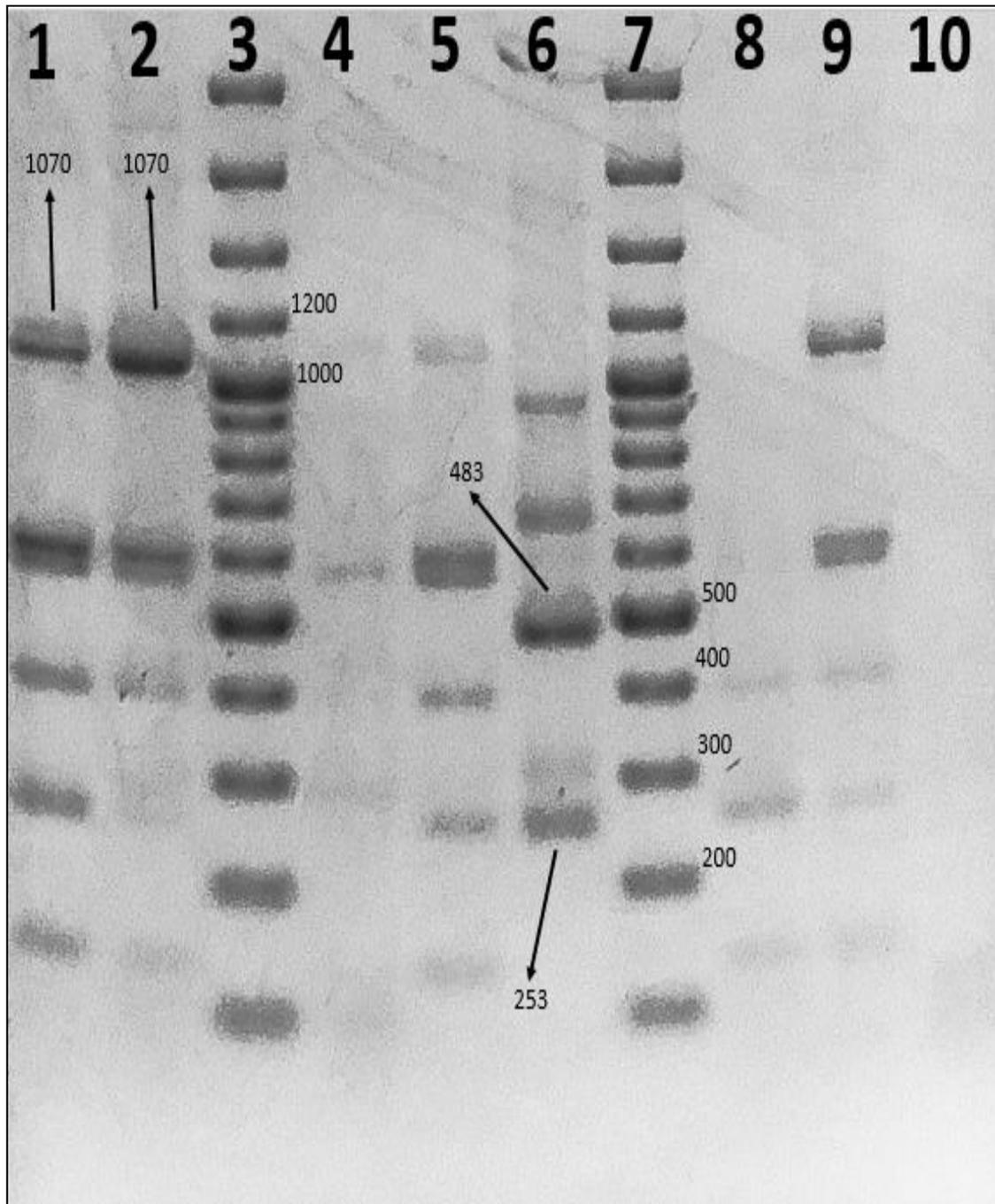


Figura 17: Segundo gel de electroforesis obtenido a partir de la PCR de todas las colonias transformantes del plásmido producto de la ligación. Los carriles “1”, “2”, “4”, “5”, “8” y “9” corresponden a las colonias de la placa con bacterias transformantes usando la ratio 3:1 asignadas con los números “2”, “3”, “4”, “5”, “6” y “7”, respectivamente. Los carriles “3” y “7” corresponden al marcador. El carril “6” corresponde al control positivo de la PCR. El carril “10” corresponde al control negativo de la PCR. Se observan las bandas amplificadas esperadas.

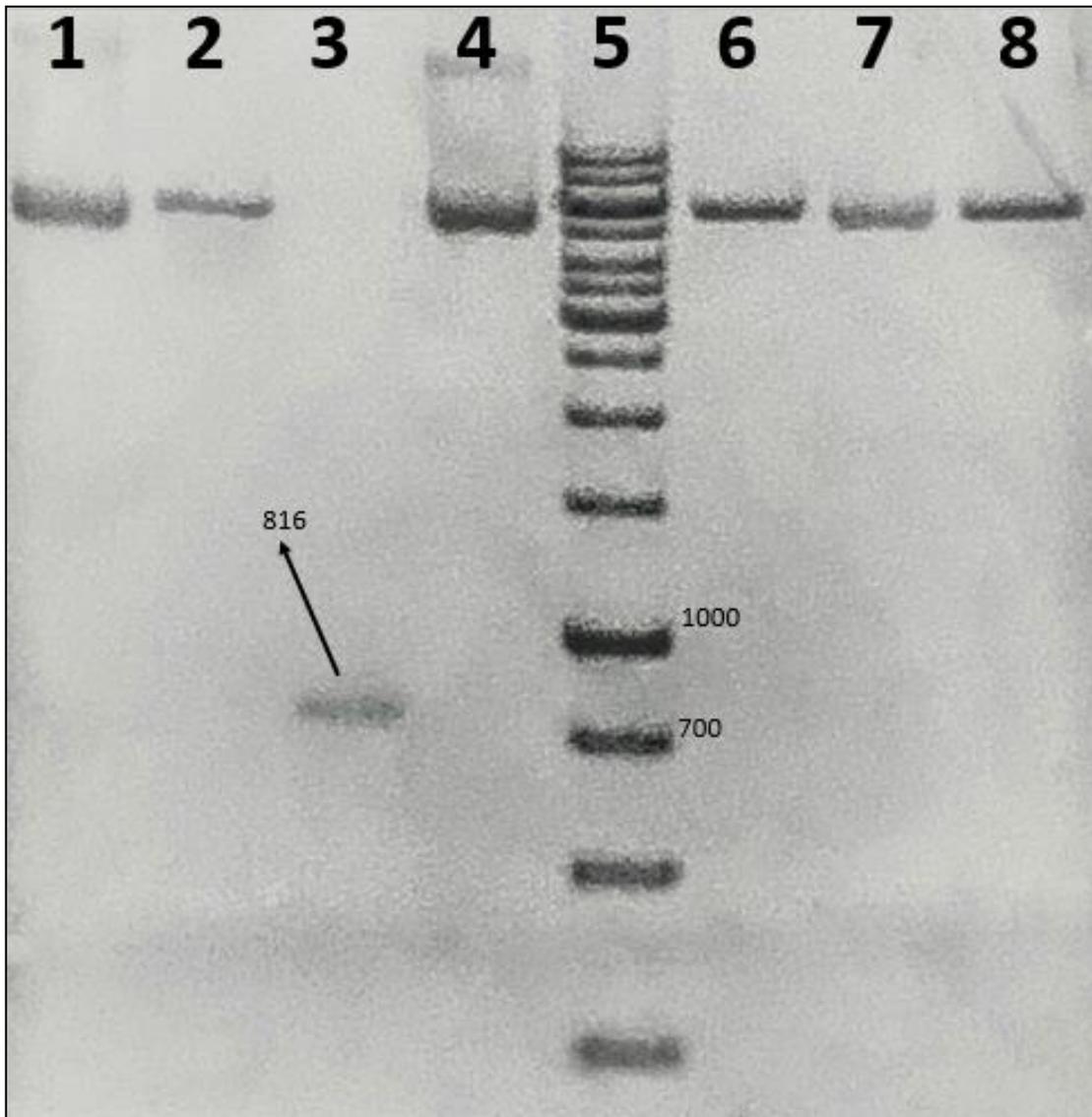


Figura 18: Gel de electroforesis para comprobar la identidad del plásmido “pET_Duet_Encap”. 1) Plásmido “pET_Duet” no digerido. 2) Vector de expresión usado para la ligación (purificado). 3) Inserto usado para la ligación (purificado). 4) Plásmido “pET_Duet_Encap” no digerido proveniente de la colonia asignada con el número “2” de la placa con bacterias transformantes usando la ratio 5:1. 5) Marcador. 6) Plásmido “pET_Duet_Encap” mencionado previamente digerido con la enzima “NdeI”. 7) Plásmido “pET_Duet_Encap” no digerido proveniente de la colonia asignada con el número “2” de la placa con bacterias transformantes usando la ratio 3:1. 8) Plásmido “pET_Duet_Encap” mencionado previamente digerido con la enzima “NdeI”. El valor del tamaño del inserto obtenido fue el esperado; sin embargo, como no se pudieron distinguir las diferencias de los tamaños de las bandas obtenidas en los demás carriles, el gel se corrió por un tiempo más y los resultados se muestran en la figura “19”.

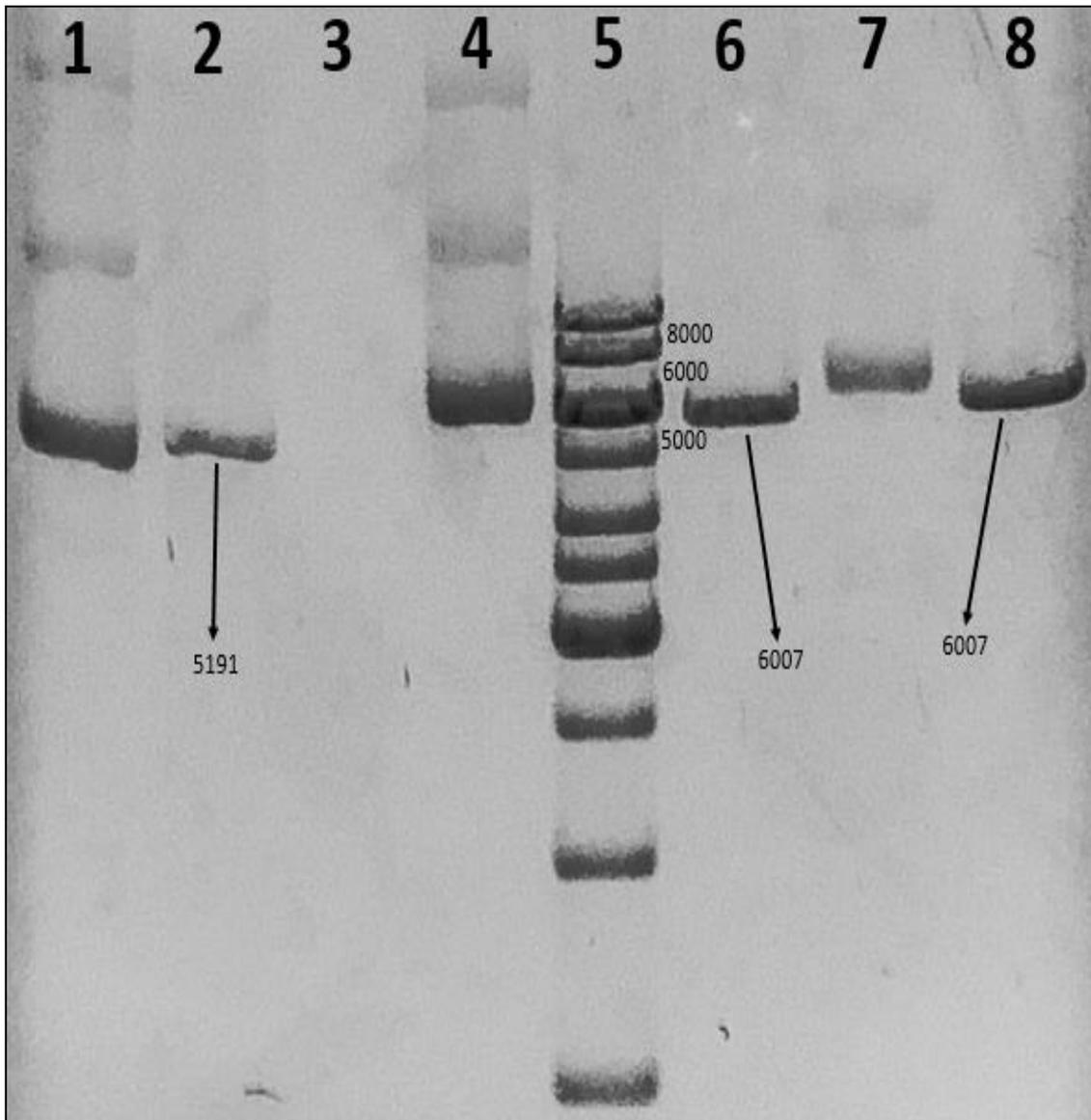


Figura 19: Gel de electroforesis para comprobar la identidad del plásmido “pET_Duet_Encap” (continuación). Los valores de los tamaños obtenidos fueron los esperados. Además, se puede observar una clara diferencia entre los plásmidos no digeridos “pET_Duet” y “pET_Duet_Encap”.

La aplicación de una PCR para identificar a los clones que contenían el plásmido “pET_Duet_Encap”, fue una ventaja debido a las características que posee el vector de expresión usado en la ligación. Este vector proviene del plásmido “pET_Duet”, cuya nomenclatura “pET” atribuye a una familia de vectores en donde la expresión del ADN que se busca insertar es controlada por un promotor y terminador denominados “T7” (Shilling et al., 2020).

Actualmente, existe una enorme variedad de plásmidos que poseen el promotor y terminador “T7”, lo que permite el uso frecuente de estas secuencias como puntos de anclaje de cebadores universales. Es esto último lo que facilita la identificación de alguna secuencia

clonada en dichos vectores, ya que se ahorra mucho el tiempo destinado al diseño de cebadores y las condiciones óptimas de PCR se encuentran ya establecidas (Zanders, 2010).

Por otro lado, gracias a los mapas de los plásmidos usados en esta investigación (disponibles en la sección del Anexo), se sabe que “pET_Duet” posee dos promotores y un único terminador “T7”; mientras que el plásmido “pET_Duet_Encap”, solo posee un promotor y terminador “T7”. Lo anterior no explica la cantidad total de bandas amplificadas observadas en los geles de electroforesis de la PCR de colonias, sin embargo, si solo se consideran las bandas amplificadas esperadas y el valor de sus tamaños obtenidos, sí se puede afirmar que el método de PCR fue efectivo.

4.5. Expresión de proteínas encapsulinas a partir del plásmido “pET_Duet_Encap”

Para comprobar el sistema de expresión de proteínas encapsulinas, se hizo un ensayo de expresión con volúmenes pequeños y los resultados fueron analizados mediante SDS – PAGE (Figura 20). El valor teórico del peso molecular del monómero de la proteína encapsulina es 30.7 KDa. El gel mostró la presencia de una banda predominante de peso cercano a 30 kDa que corresponde con lo esperado.

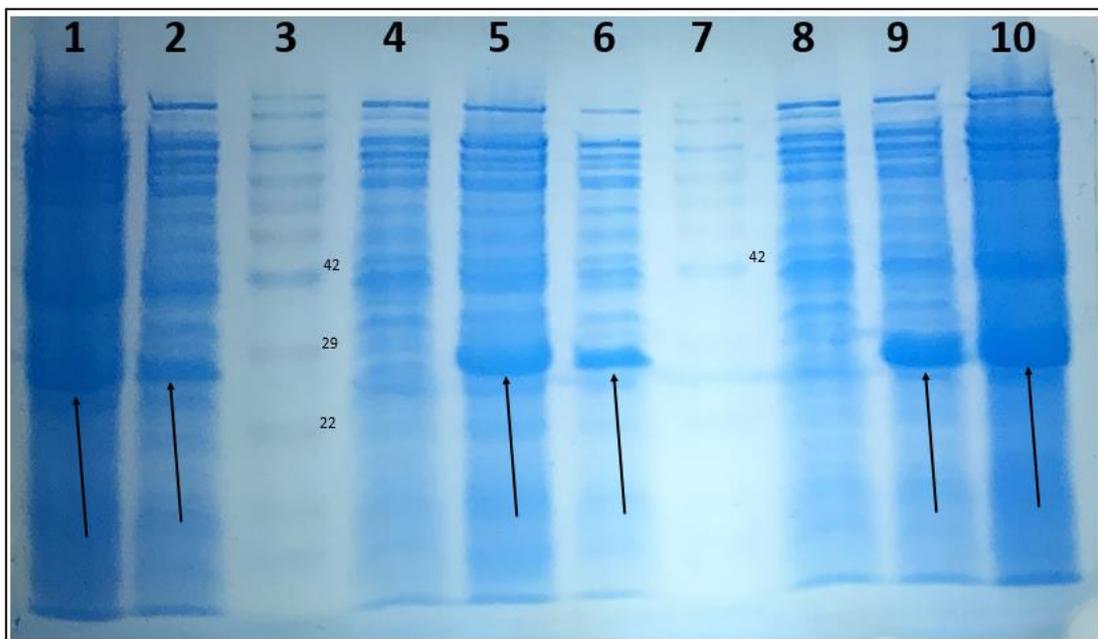


Figura 20: SDS – PAGE para comprobar el sistema de expresión de las proteínas encapsulinas. 1) Lisado soluble obtenido a partir de la inducción con IPTG a 18°C. 2) Lisado anterior diluido seis veces. 3) Marcador. 4) Control (sin inducción) a 18°C. 5) Lisado soluble obtenido a partir de la inducción con IPTG a 37°C. 6) Lisado anterior diluido seis veces. 7) Marcador. 8) Control (sin inducción) a 37°C. 9) Lisado siguiente diluido seis veces. 10) Lisado soluble obtenido a partir de la inducción con IPTG a 25°C. Las flechas señalan a las bandas que corresponden al peso del monómero de la proteína encapsulina (30.7 KDa). En el gel no se observan los controles (sin inducción) a 25°C debido a que ya no había más carriles disponibles; sin embargo, en otro gel se pudo comprobar que tampoco mostraban la banda correspondiente al monómero de la encapsulina (resultados no mostrados).

Después, se realizó el trabajo con volúmenes mayores de cultivo con el fin de purificar. En dicho procedimiento se obtuvo la fracción soluble del lisado y fue filtrada. De esta última se tomó un pequeño volumen para su posterior análisis con SDS – PAGE (Figura 26).

Las proteínas encapsulinas fueron producidas bajo un sistema de expresión recombinante en la cepa “BLR (DE3)” de *E. coli*. En este sistema, se usó el plásmido “pET_Duet” como vector de expresión del gen de encapsulina, por lo que la región promotora fue únicamente reconocida por la “ARN polimerasa del fago T7” (Rosano & Ceccarelli, 2014). Así mismo, esta “ARN polimerasa” fue producida por la cepa “BLR (DE3)”, debido a que posee incorporado en su genoma el gen que la codifica y está controlado por un promotor “Lac”. Por lo tanto, todo el sistema fue inducible mediante la adición de IPTG, permitiendo así un control total de la síntesis de encapsulinas recombinantes (Rosano et al., 2019).

Otras investigaciones en donde también se produjeron proteínas encapsulinas recombinantes de manera óptima, utilizaron las cepas “Rosetta (DE3)” (Orner, 2015) y “BL21 (DE3)” (Lagoutte et al., 2018) de *E.coli*, además de plásmidos de expresión con la nomenclatura “pET”. Estas cepas y la “BLR (DE3)” tienen en común la codificación del gen de la “ARN polimerasa del fago T7” bajo el control del promotor “Lac”, por lo que estos resultados refuerzan el uso de este tipo de *E.coli* modificadas para la producción de encapsulinas mediante un sistema de inducción por IPTG.

4.6. Purificación de proteínas encapsulinas a través del equipo “FPLC AKTA EXPLORER”

El filtrado de la fracción soluble del lisado fue añadido primero a la columna multimodal “HiScreen CaptoCore 700”. Se recolectaron las fracciones (primer eluato) pertenecientes al “Flowthrough” (Figura 21). Una pequeña muestra de cada fracción fue analizada mediante SDS – PAGE con el fin de distinguir a las fracciones que contenían la proteína encapsulina más concentrada (Figura 22 y 23).

Luego de seleccionar las fracciones con mayor concentración de encapsulinas y haberlas centrifugado, el sobrenadante obtenido fue añadido a la columna de exclusión molecular “HiLoad 26/600”. Se recolectaron todas las fracciones (segundo eluato) pertenecientes al primer pico (Figura 24) y se analizaron con SDS – PAGE (Figura 25).

Adicionalmente, con el fin de observar el proceso total de la purificación, se realizó una comparación mediante SDS – PAGE entre la muestra añadida a la columna “HiScreen

CaptoCore 700” (filtrado), la muestra añadida a la columna “HiLoad 26/600” y algunas de las fracciones del segundo eluato (Figura 26).

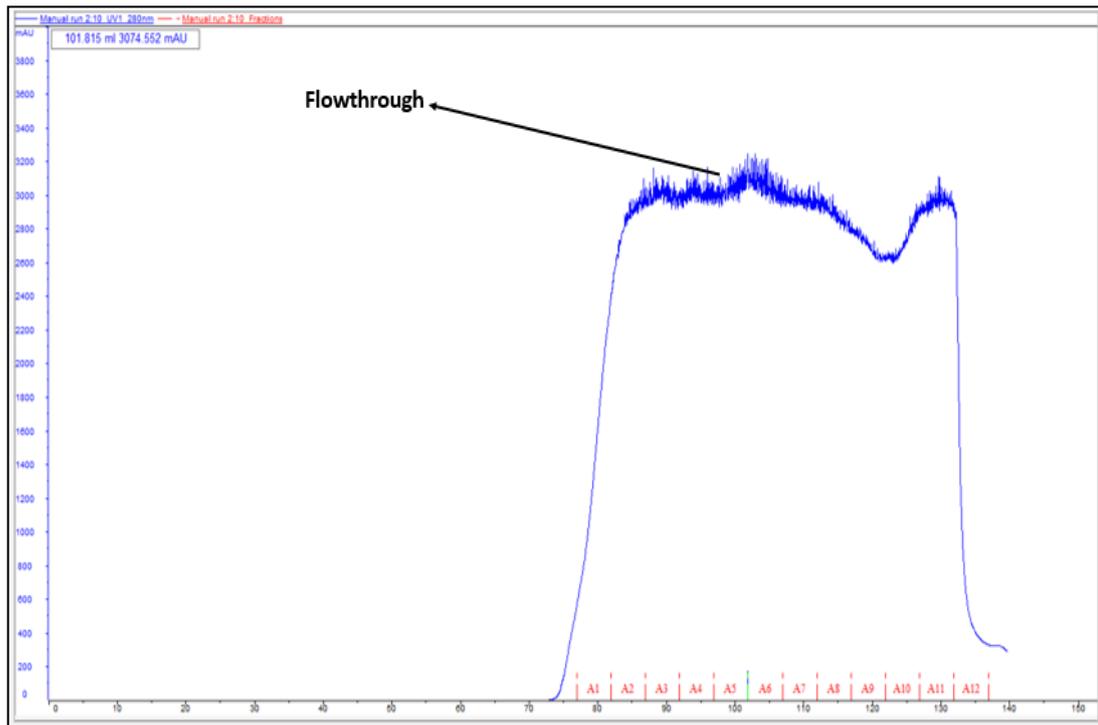


Figura 21: Cromatograma del filtrado añadido a la columna “HiScreen CaptoCore 700”. Se recolectaron las fracciones pertenecientes al “Flowthrough” (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11 y A12).

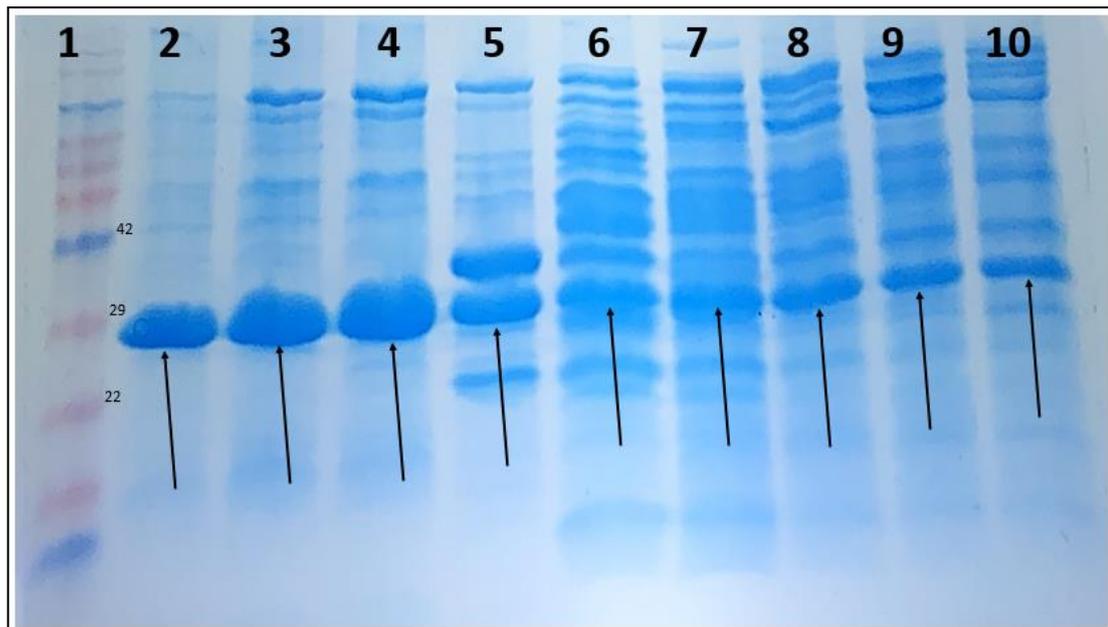


Figura 22: SDS – PAGE de las fracciones obtenidas con la columna “HiScreen CaptoCore 700”. 1) Marcador. 2) Fracción A1. 3) Fracción A2. 4) Fracción A3. 5) Fracción A4. 6) Fracción A5. 7) Fracción A6. 8) Fracción A7. 9) Fracción A8. 10) Fracción A9. Las flechas señalan las bandas pertenecientes al monómero de la proteína encapsulina (30.7 KDa).

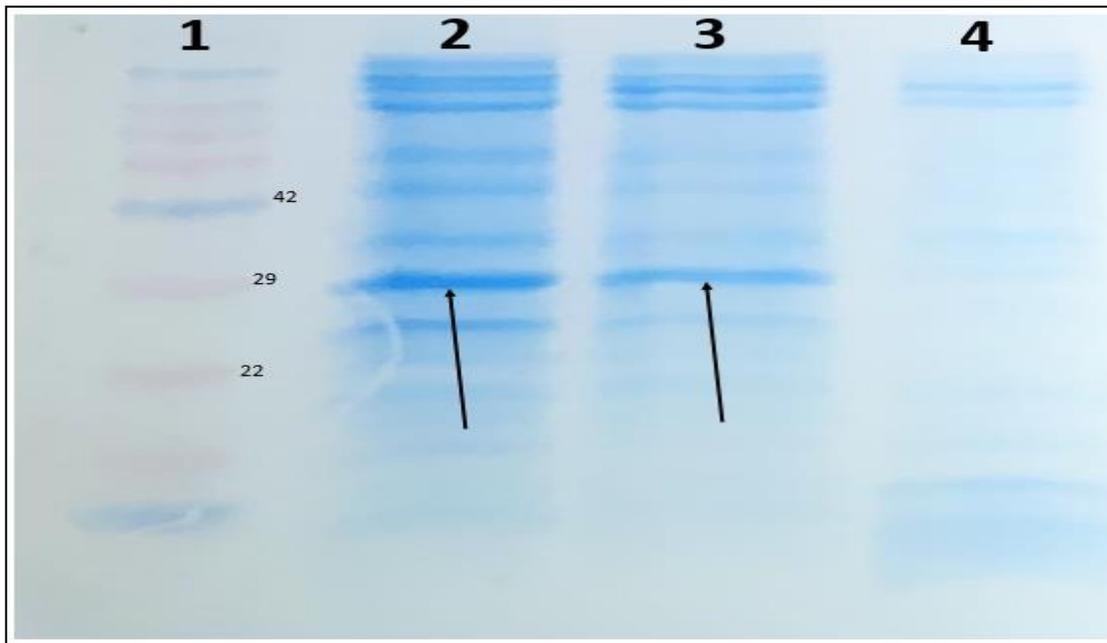


Figura 23: SDS – PAGE de las fracciones obtenidas con la columna “HiScreen CaptoCore 700” (continuación). 1) Marcador. 2) Fracción A10. 3) Fracción A11. 4) Fracción A12. 5) Fracción A4. Las flechas señalan las bandas pertenecientes al monómero de la proteína encapsulina (30.7 KDa).

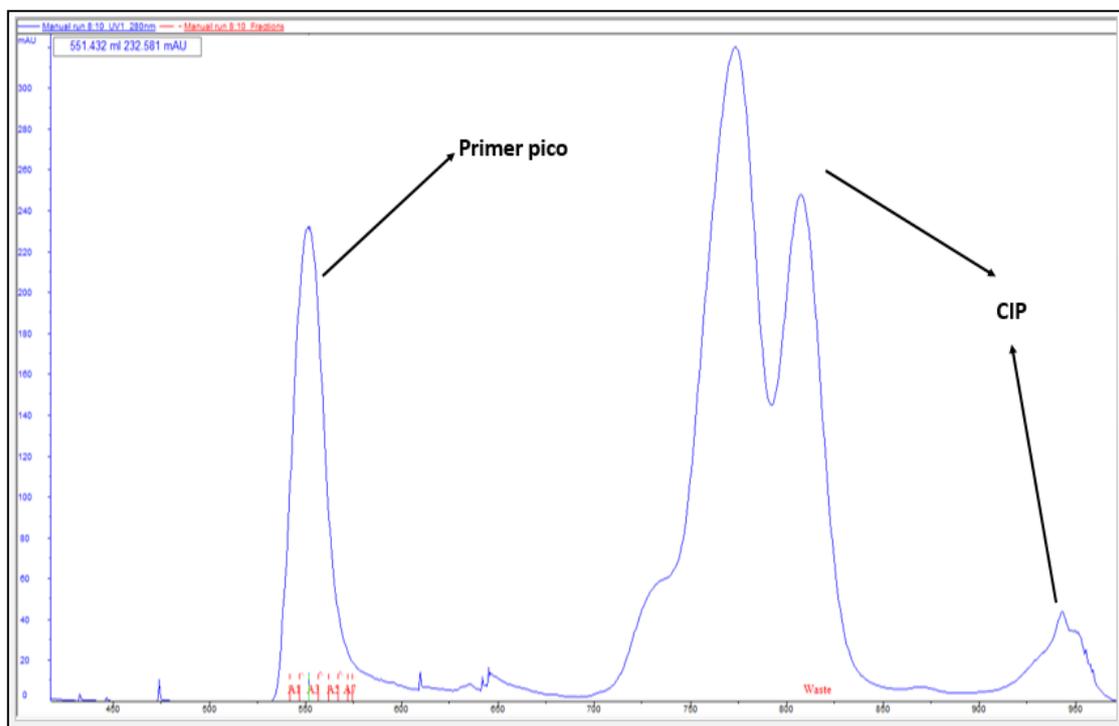


Figura 24: Cromatograma del sobrenadante añadido a la columna “HiLoad 26/600”. Se recolectaron las fracciones pertenecientes al primer pico (A1, A2, A3, A4, A5, A6 y A7). Los demás picos pertenecen al CIP (“Cleaning In Place”) y están relacionados con la limpieza de la columna.

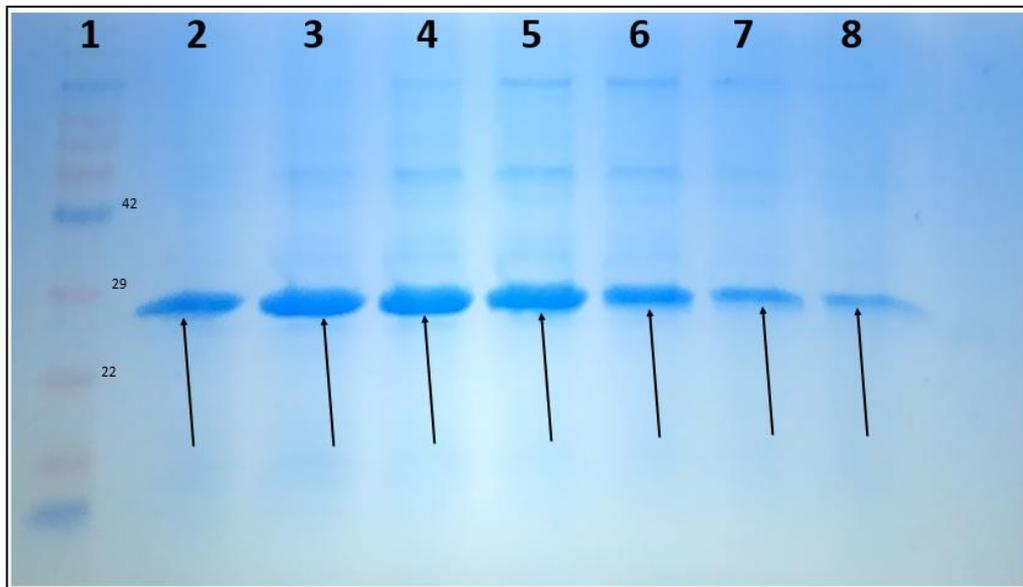


Figura 25: SDS – PAGE de las fracciones obtenidas con la columna “HiLoad 26/600”. 1) Marcador. 2) Fracción A1. 3) Fracción A2. 4) Fracción A3. 5) Fracción A4. 6) Fracción A5. 7) Fracción A6. 8) Fracción A7. Las flechas señalan las bandas pertenecientes al monómero de la proteína encapsulina (30.7 KDa).

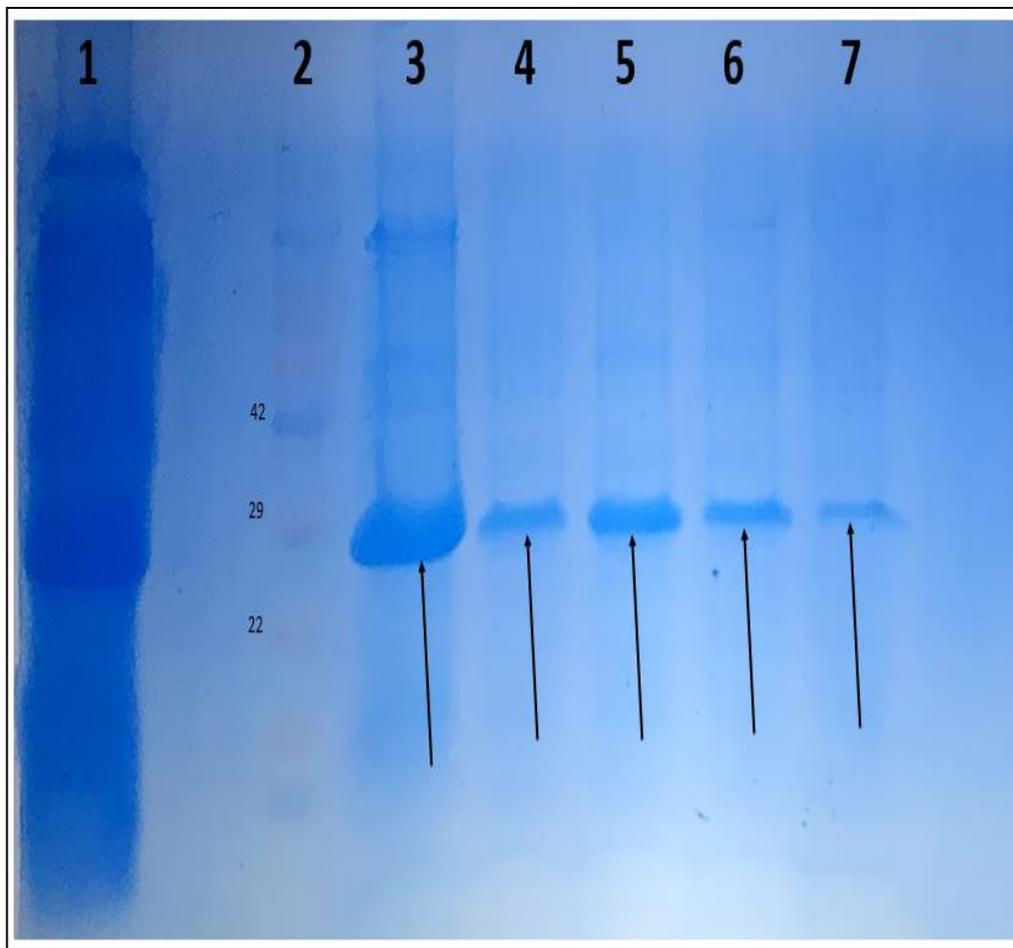


Figura 26: SDS – PAGE del proceso total de purificación. 1) Filtrado (muestra de la columna “HiScreen CaptoCore 700”). 2) Marcador. 3) Sobrenadante (muestra de la columna “HiLoad 26/600”). Las siguientes fracciones hacen referencia a las que se obtuvieron con la columna “HiLoad 26/600”: 4) Fracción A1. 5) Fracción A2. 6) Fracción A7. 7) Fracción A8. Las flechas señalan las bandas pertenecientes al monómero de la proteína encapsulina (30.7 KDa).

Los resultados de la primera cromatografía a través de la columna “HiScreen CaptoCore 700”, demostraron que es posible conseguir una mayor concentración y pureza de encapsulinas en las tres primeras fracciones del “Flowthrough”. Sin embargo, esto difiere ligeramente de los resultados de algunos otros protocolos, ya que en ellos se obtuvo la nanopartícula acompañada de una alta concentración de la proteína de membrana externa de *E.coli* “OmpF”, que luego fue separada a través del uso de un detergente antes de proceder con la segunda cromatografía mediada por la columna “HiLoad 26/600” (Lagoutte et al., 2016). Aparentemente, la mayor parte de esta proteína contaminante fue desplazada como insoluble en nuestro proceso de centrifugación que sigue a la lisis celular. La fuerza centrífuga y la duración de la centrifugación se ajustan para asegurar que las proteínas insolubles sedimenten, y así la fracción del sobrenadante contenga una gran mezcla de proteínas solubles que luego serán purificadas según el interés del usuario (Lodish et al., 2000). Probablemente, la combinación de condiciones de cultivo y lisis favorecieron que la proteína OmpF se encuentre asociada en corpúsculos o fragmentos de membrana, lo que permitió que sedimentara formando parte de la fracción insoluble.

Por otro lado, en el gel que demuestra el proceso total de la purificación, se puede observar que las bandas correspondientes a la encapsulina tenían mayor pureza después de cada cromatografía. Esto es debido a que luego del paso del filtrado por la columna “HiScreen CaptoCore 700”, las encapsulinas ensambladas correctamente son recuperadas en las primeras fracciones del “Flowthrough”, sin embargo, no están del todo puras, ya que también se observa la presencia de otras bandas que podrían corresponder a las impurezas que no fueron retenidas en la resina de la columna (Lagoutte et al., 2016). En consecuencia, el posterior proceso cromatográfico a través de la columna “HiLoad 26/600”, permitió separar a las encapsulinas correctamente ensambladas con un alto grado de pureza.

En conjunto, estos resultados demuestran una purificación eficaz de las encapsulinas mediante técnicas modernas de cromatografía.

4.7. Caracterización de proteínas encapsulinas mediante la técnica de DLS a través del equipo “BROOKHAVEN 90PLUS”

Se tomaron muestras de encapsulinas purificadas a partir de un microtubo de 1 mg/mL conservado a -70°C y se prepararon dos diluciones en serie a una concentración de 1/10 y 1/100 (v/v) utilizando PBS. La primera dilución (0.1 mg/mL) arrojó un diámetro observado igual a 22.24 nm (Figura 27). Luego, se diluyó nuevamente a partir de la muestra anterior y

se consiguió una concentración final igual a 0.01 mg/mL. También se analizó y el valor del diámetro obtenido fue igual a 26.94 nm (Figura 28).

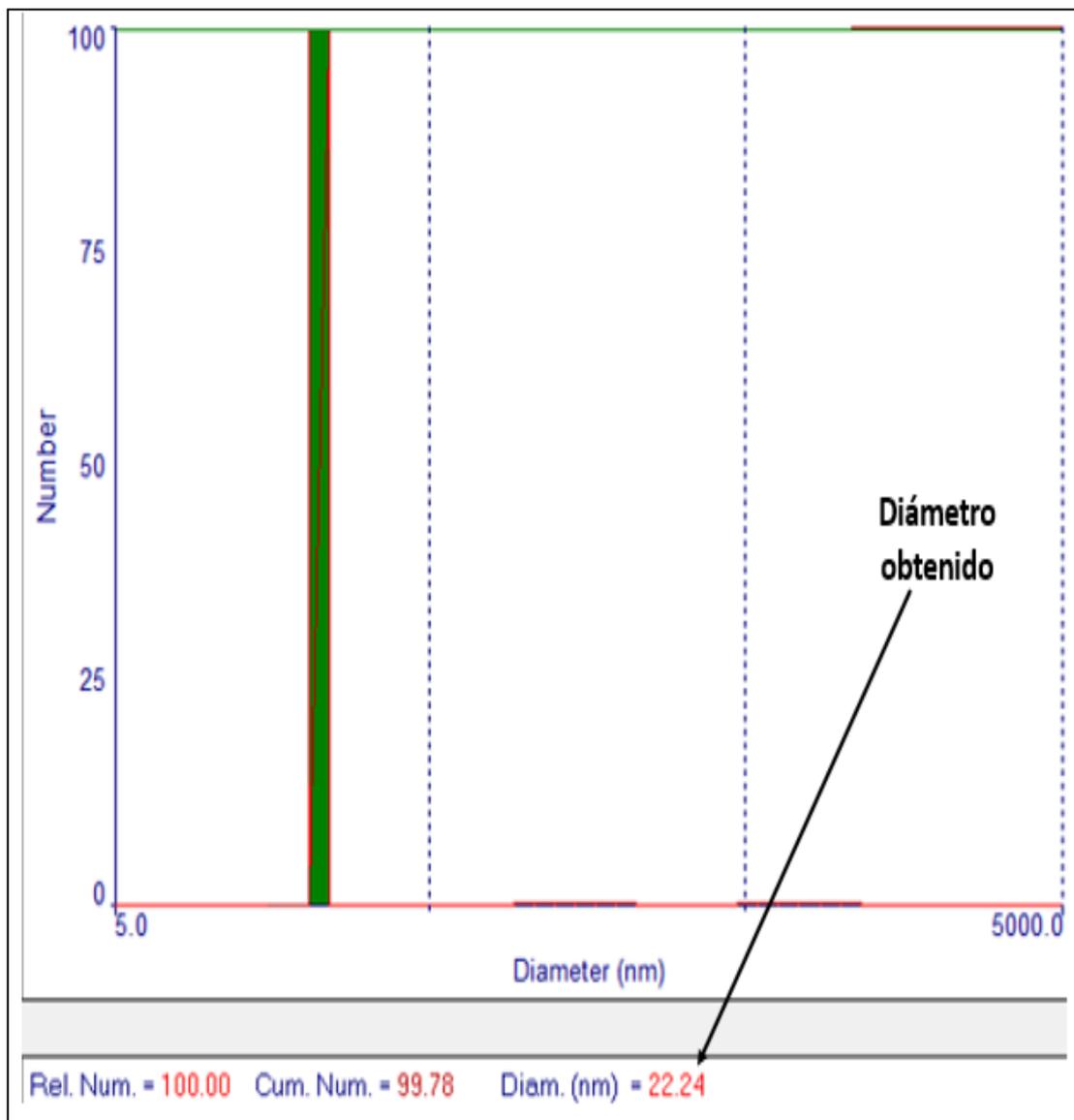


Figura 27: Resultado del análisis mediante DLS obtenido con la primera dilución de la muestra de encapsulina. La flecha señala el diámetro obtenido (22.24 nm).

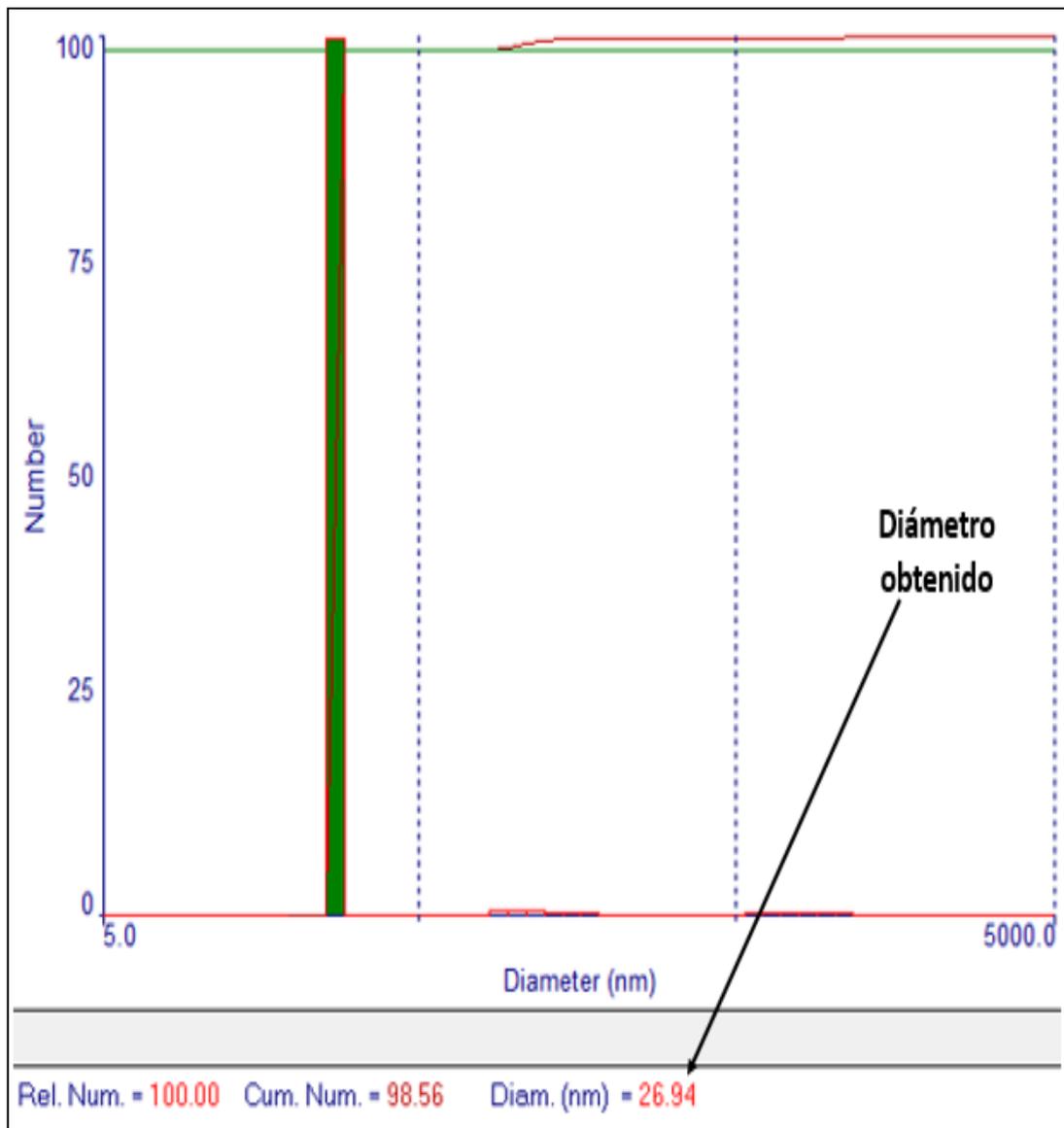


Figura 28: Resultado del análisis mediante DLS obtenido con la segunda dilución de la muestra de encapsulina. La flecha señala el diámetro obtenido (26.94 nm).

Los análisis mediante DLS demostraron que las proteínas encapsulinas purificadas poseen un diámetro muy cercano al teórico, cuyo valor ronda entre los 20 y 25 nm (Sutter et al., 2008). Otras investigaciones en las que también se usó la técnica DLS obtuvieron valores de diámetros aproximados a 24 nm (Cassidy-Amstutz et al., 2016) y 28 nm (Diaz et al., 2021). Adicionalmente, sus resultados se vieron apoyados analizando las muestras de encapsulinas con microscopía electrónica de transmisión (TEM), ya que pudieron confirmar que los diámetros observados correspondían a encapsulinas correctamente ensambladas.

Además, es importante mencionar algunos factores que influyen en la obtención del diámetro de la nanopartícula. El fundamento de la técnica de DLS se basa en la ecuación de Stokes – Einstein (Ecuación 1), y una variable importante es la viscosidad del medio (Carvalho et al.,

2018). La presencia de sales y glicerol en las soluciones de proteínas provoca una variación de la viscosidad (Hong et al., 2018) que es posible determinarla gracias al desarrollo de parámetros matemáticos (Cheng, 2008). De esta manera, los diámetros obtenidos en los resultados mostrados anteriormente (Figura 27 y 28) tendrían que ser modificados, ya que en los análisis de DLS únicamente se consideró el valor de la viscosidad del agua a 25°C y 1 atm (0.890 cP), es decir, sin la influencia de las sales presentes en el PBS y del glicerol. Así, el nuevo valor de la viscosidad para la primera dilución sería 0.962 cP y el diámetro obtenido mediante la ecuación de Stokes – Einstein (Ecuación 1) resultaría igual a 20.58 nm; mientras que, para la segunda dilución, los nuevos valores de la viscosidad y el diámetro serían 0.899 cP y 26.68 nm, respectivamente.

Por lo tanto, con los nuevos valores de los diámetros calculados debido a la variación de la viscosidad y los resultados del análisis a través de DLS obtenidos en esta investigación, se puede inferir que las encapsulinas purificadas están correctamente ensambladas; sin embargo, es necesaria su comprobación usando microscopía electrónica de transmisión.

V. CONCLUSIONES

- Se consiguió la producción de proteínas encapsulinas a través de un sistema recombinante de *E. coli* mediante el correcto diseño del plásmido que posee la secuencia del gen de encapsulina de *T. maritima*.
- Se logró purificar y caracterizar mediante DLS las nanopartículas encapsulinas de *T. maritima*.
- Se confirmó la pureza de las encapsulinas producidas y, además, con la información del diámetro obtenido es posible inferir que dichas nanopartículas están ensambladas correctamente.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda confirmar mediante microscopía electrónica de transmisión el correcto ensamblado de las proteínas encapsulinas producidas
- Se recomienda realizar ensayos para comprobar la estabilidad de las nanopartículas a diferentes valores de pH y temperatura.
- Por otro lado, también sería de mucha importancia realizar ensayos que permitan dar información acerca de la funcionalidad de las encapsulinas producidas. Esto se podría realizar a través de una coexpresión de encapsulinas con alguna molécula reportera que esté diseñada para funcionar como proteína de carga de dichas nanopartículas.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, O.-S. J., Miguel, T.-S., Inocencio, H.-C., & Blondy, C.-C. (2017). A quick and effective in-house method of DNA purification from agarose gel, suitable for sequencing. *3 Biotech*, 7(3). doi: <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0851-1>
- Akita, F., Chong, K. T., Tanaka, H., Yamashita, E., Miyazaki, N., Nakaishi, Y., Suzuki, M., Namba, K., Ono, Y., Tsukihara, T., & Nakagawa, A. (2007). The crystal structure of a virus-like particle from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* provides insight into the evolution of viruses. *Journal of Molecular Biology*, 368(5), 1469-1483. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.02.075>
- Aumiller, W. M., Uchida, M., & Douglas, T. (2018). Protein cage assembly across multiple length scales. *Chemical Society Reviews*, 47(10), 3433-3469. doi: <https://doi.org/10.1039/C7CS00818J>
- Brekkan, E. (2018). Multimodal Chromatography. En *Biopharmaceutical Processing: Development, Design, and Implementation of Manufacturing Processes* (pp. 409-419). doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100623-8.00020-7>
- Carvalho, P. M., Felício, M. R., Santos, N. C., Gonçalves, S., & Domingues, M. M. (2018). Application of Light Scattering Techniques to Nanoparticle Characterization and Development. *Frontiers in Chemistry*, 6, 237. doi: <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00237>
- Cassidy-Amstutz, C., Oltrogge, L., Going, C. C., Lee, A., Teng, P., Quintanilla, D., East-Seletsky, A., Williams, E. R., & Savage, D. F. (2016). Identification of a Minimal Peptide Tag for in Vivo and in Vitro Loading of Encapsulin. *Biochemistry*, 55(24), 3461-3468. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00294>
- Cheng, N.-S. (2008). Formula for the Viscosity of a Glycerol–Water Mixture. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 47(9), 3285-3288. doi: <https://doi.org/10.1021/ie071349z>
- Coskun, O. (2016). Separation techniques: Chromatography. *Northern Clinics of Istanbul*, 3(2), 156-160. doi: <https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>

- Diaz, D., Vidal, X., Sunna, A., & Care, A. (2021). Bioengineering a Light-Responsive Encapsulin Nanoreactor: A Potential Tool for In Vitro Photodynamic Therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 13(7), 7977-7986. doi: <https://doi.org/10.1021/acsami.0c21141>
- Effio, C. L., & Hubbuch, J. (2015). Next generation vaccines and vectors: Designing downstream processes for recombinant protein-based virus-like particles. *Biotechnology Journal*, 10(5), 715-727. doi: <https://doi.org/10.1002/biot.201400392>
- Fang, Y., Huang, F., Faulkner, M., Jiang, Q., Dykes, G. F., Yang, M., & Liu, L.-N. (2018). Engineering and Modulating Functional Cyanobacterial CO₂-Fixing Organelles. *Front. Plant Sci.* doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00739>
- Giessen, T. W. (2016). Encapsulins: Microbial nanocompartments with applications in biomedicine, nanobiotechnology and materials science. *Current Opinion in Chemical Biology*, 34, 1-10. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.05.013>
- Giessen, T. W., & Silver, P. A. (2016). Converting a Natural Protein Compartment into a Nanofactory for the Size-Constrained Synthesis of Antimicrobial Silver Nanoparticles. *ACS Synthetic Biology*, 5(12), 1497-1504. doi: <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00117>
- Giessen, T. W., & Silver, P. A. (2017). Widespread distribution of encapsulin nanocompartments reveals functional diversity. *Nature Microbiology*, 2(6), 1-11. doi: <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.29>
- Harwood, L. M., & Moody, C. J. (1990). *Experimental organic chemistry principles and practice*. Oxford [England] Blackwell Scientific Publications. <https://trove.nla.gov.au/version/209827232>
- Hong, T., Iwashita, K., & Shiraki, K. (2018). Viscosity Control of Protein Solution by Small Solutes: A Review. *Current Protein & Peptide Science*, 19(8), 746-758. doi: <https://doi.org/10.2174/1389203719666171213114919>
- Jia, B., & Jeon, C. O. (2016). High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Current status and future perspectives. *Open Biology*, 6(8). doi: <https://doi.org/10.1098/rsob.160196>

- Katevatis, C., Fan, A., & Klapperich, C. M. (2017). Low concentration DNA extraction and recovery using a silica solid phase. *PloS One*, *12*(5), e0176848. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176848>
- Lagoutte, P., Mignon, C., Donnat, S., Stadthagen, G., Mast, J., Sodoyer, R., Lugari, A., & Werle, B. (2016). Scalable chromatography-based purification of virus-like particle carrier for epitope based influenza A vaccine produced in *Escherichia coli*. *Journal of Virological Methods*, *232*, 8-11. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.02.011>
- Lagoutte, P., Mignon, C., Stadthagen, G., Potisopon, S., Donnat, S., Mast, J., Lugari, A., & Werle, B. (2018). Simultaneous surface display and cargo loading of encapsulin nanocompartments and their use for rational vaccine design. *Vaccine*, *36*(25), 3622-3628. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.05.034>
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, *62*. doi: <https://doi.org/10.3791/3923>
- Liu, W., Sun, Y., Yu, J., Chen, Q., Bao, Z., Fan, X., Liang, Y., Peng, X., Xian, M., & Nian, R. (2019). Advance chromatin extraction improves the performance of electropositive mixed-mode chromatography as a capture step and enables its integration with void-exclusion anion exchange chromatography as a two column step purification platform for monoclonal antibody production. *Biochemical Engineering Journal*, *142*, 145-152. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.11.018>
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000). Purifying, Detecting, and Characterizing Proteins. *Molecular Cell Biology*. 4th Edition. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21589/>
- Mach, H., Volkin, D. B., Troutman, R. D., Wang, B., Luo, Z., Jansen, K. U., & Shi, L. (2006). Disassembly and reassembly of yeast-derived recombinant human papillomavirus virus-like particles (HPV VLPs). *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *95*(10), 2195-2206. doi: <https://doi.org/10.1002/jps.20696>
- McHugh, C. A., Fontana, J., Nemecek, D., Cheng, N., Aksyuk, A. A., Heymann, J. B., Winkler, D. C., Lam, A. S., Wall, J. S., Steven, A. C., & Hoiczky, E. (2014). A virus capsid-like nanocompartment that stores iron and protects bacteria from

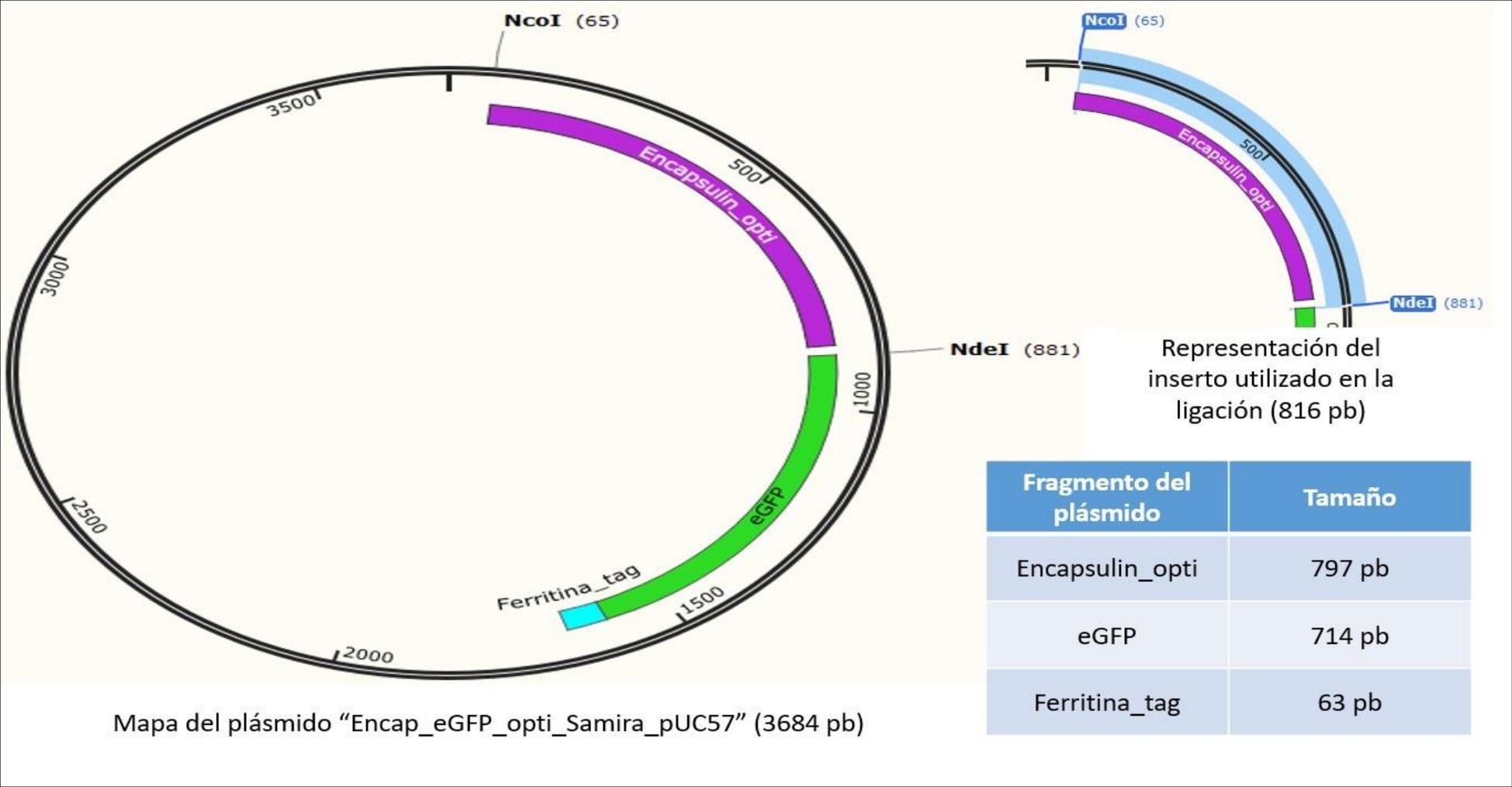
- oxidative stress. *The EMBO Journal*, 33(17), 1896-1911. doi: <https://doi.org/10.15252/emj.201488566>
- Moon, H., Lee, J., Min, J., & Kang, S. (2014). Developing Genetically Engineered Encapsulin Protein Cage Nanoparticles as a Targeted Delivery Nanoplatfom. *Biomacromolecules*, 15(10), 3794-3801. doi: <https://doi.org/10.1021/bm501066m>
- Motohashi, K. (2019). Development of highly sensitive and low-cost DNA agarose gel electrophoresis detection systems, and evaluation of non-mutagenic and loading dye-type DNA-staining reagents. *PloS One*, 14(9), e0222209. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222209>
- Nichols, R. J., Cassidy-Amstutz, C., Chaijarasphong, T., & Savage, D. F. (2017). Encapsulins: Molecular biology of the shell. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 52(5), 583-594. doi: <https://doi.org/10.1080/10409238.2017.1337709>
- Ó'Fágáin, C., Cummins, P. M., & O'Connor, B. F. (2011). Gel-Filtration Chromatography. En D. Walls & S. T. Loughran (Eds.), *Protein Chromatography: Methods and Protocols* (pp. 25-33). Humana Press. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0_2
- Oliva, A., Fariña, J., & Llabrés, M. (1997). Analysis of Peptides and Proteins: Evaluation of Purity, Stability, and Structural Characterization of Insulin. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 23(9), 915-927. doi: <https://doi.org/10.3109/03639049709148696>
- Orner, B. P. (Ed.). (2015). *Protein Cages: Methods and Protocols*. Humana Press. doi: <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2131-7>
- Pham, P. V. (2018). Chapter 19 - Medical Biotechnology: Techniques and Applications. En D. Barh & V. Azevedo (Eds.), *Omics Technologies and Bio-Engineering* (pp. 449-469). Academic Press. doi: <https://doi.org/10.1016/B9780128046593.00019-1>
- Rahmanpour, R., & Bugg, T. D. H. (2013). Assembly in vitro of *Rhodococcus jostii* RHA1 encapsulin and peroxidase DypB to form a nanocompartment. *The FEBS Journal*, 280(9), 2097-2104. doi: <https://doi.org/10.1111/febs.12234>

- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5, 172. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Rosano, G. L., Morales, E. S., & Ceccarelli, E. A. (2019). New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Science*, 28(8), 1412-1422. doi: <https://doi.org/10.1002/pro.3668>
- Rother, M., Nussbaumer, M. G., Renggli, K., & Bruns, N. (2016). Protein cages and synthetic polymers: A fruitful symbiosis for drug delivery applications, bionanotechnology and materials science. *Chemical Society Reviews*, 45(22), 6213-6249. doi: <https://doi.org/10.1039/c6cs00177g>
- Roy, S., & Kumar, V. (2014). A Practical Approach on SDS PAGE for Separation of Protein. *International Journal of Science and Research (IJSR)*.
- Rurup, W. F., Snijder, J., Koay, M. S. T., Heck, A. J. R., & Cornelissen, J. J. L. M. (2014). Self-Sorting of Foreign Proteins in a Bacterial Nanocompartment. *Journal of the American Chemical Society*, 136(10), 3828-3832. doi: <https://doi.org/10.1021/ja410891c>
- Sasaki, E., Böhringer, D., van de Waterbeemd, M., Leibundgut, M., Zschoche, R., Heck, A. J. R., Ban, N., & Hilvert, D. (2017). Structure and assembly of scalable porous protein cages. *Nature Communications*, 8(1), 1-10. doi: <https://doi.org/10.1038/ncomms14663>
- Schumann, W., & Ferreira, L. C. S. (2004). Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Genetics and Molecular Biology*, 27(3), 442-453. doi: <https://doi.org/10.1590/S1415-47572004000300022>
- Shilling, P. J., Mirzadeh, K., Cumming, A. J., Widesheim, M., Köck, Z., & Daley, D. O. (2020). Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in *Escherichia coli*. *Communications Biology*, 3(1), 1-8. doi: <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0939-8>
- Shively, J. M., Ball, F., Brown, D. H., & Saunders, R. E. (1973). Functional organelles in prokaryotes: Polyhedral inclusions (carboxysomes) of *Thiobacillus neapolitanus*. *Science (New York, N.Y.)*, 182(4112), 584-586. doi: <https://doi.org/10.1126/science.182.4112.584>

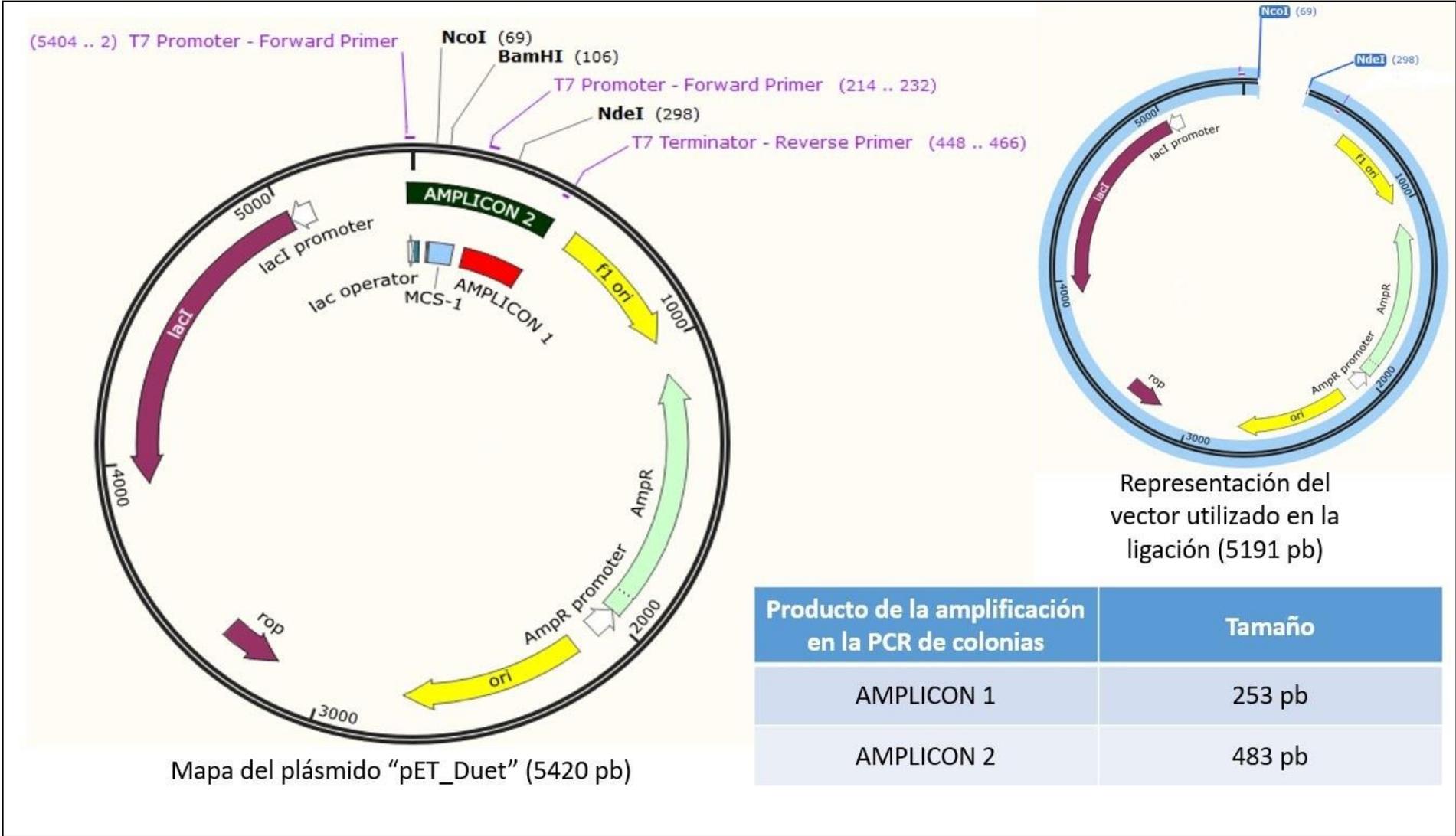
- Siddiqui, M. A. (1982). Recombinant DNA technology and its application to developmental biology. *Journal of Craniofacial Genetics and Developmental Biology*, 2(1), 75-92.
- Sun, Y., Sriramajayam, K., Luo, D., & Liao, D. J. (2012). A Quick, Cost-Free Method of Purification of DNA Fragments from Agarose Gel. *Journal of Cancer*, 3, 93-95. doi: <https://doi.org/10.7150/jca.4163>
- Sutter, M., Boehringer, D., Gutmann, S., Günther, S., Prangishvili, D., Loessner, M. J., Stetter, K. O., Weber-Ban, E., & Ban, N. (2008). Structural basis of enzyme encapsulation into a bacterial nanocompartment. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(9), 939-947. doi: <https://doi.org/10.1038/nsmb.1473>
- Tracey, J. C., Coronado, M., Giessen, T. W., Lau, M. C. Y., Silver, P. A., & Ward, B. B. (2019). The Discovery of Twenty-Eight New Encapsulin Sequences, Including Three in Anammox Bacteria. *Scientific Reports*, 9(1), 20122. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56533-5>
- Wilson, K., & Walker, J. M. (Eds.). (2009). *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology* (7th ed). Cambridge University Press.
- Zanders, E. D. (2010). *Chemical Genomics: Reviews and Protocols*. Humana Press.
- Zhang, K., & Liu, X. (2016). Mixed-mode chromatography in pharmaceutical and biopharmaceutical applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 128, 73-88. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.05.007>
- Zhang, Y., Ardejani, M. S., & Orner, B. P. (2016). Design and Applications of Protein-Cage-Based Nanomaterials. *Chemistry, an Asian Journal*, 11(20), 2814-2828. doi: <https://doi.org/10.1002/asia.201600769>

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Mapa del plásmido “Encap_eGFP_opti_Samira_pUC57” y fragmentos relacionados



Anexo 2: Mapa del plásmido “pET_Duet” y fragmentos relacionados



Anexo 3: Mapa del plásmido “pET_Duet_Encap” y fragmentos relacionados

