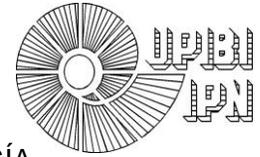




INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA



**Producción de un nanocuerpo quimérico contra el virus
del papiloma humano en *E. coli* y su purificación.**

TRABAJO ESCRITO CORRESPONDIENTE EN LA ASIGANTURA DE
ESTANCIA DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE:

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO BIOTECNÓLOGO

PRESENTA:

ARMANDO MONTOYA GARCÍA

DIRIGIDA POR : Dr. Edgar Salgado Manjarrez

EVALUADORES:

M. en C. César Agustín Jiménez Sierra

Biol. Gerardo Rodríguez Muñoz.

Ciudad de México a 24 de Noviembre del 2016

Autorización de uso de obra

Instituto Politécnico Nacional

P r e s e n t e

Bajo protesta de decir verdad el que suscribe Armando Montoya García, manifiesto ser autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de la obra titulada “Producción de un nanocuerpo quimérico contra el virus del papiloma humano en *E. coli* y su purificación”, en adelante “La Tesis” y de la cual se adjunta copia, por lo que por medio del presente y con fundamento en el artículo 27 fracción II, inciso b) de la Ley Federal del Derecho de Autor, otorgo a el Instituto Politécnico Nacional, en adelante El IPN, autorización no exclusiva para comunicar y exhibir públicamente total o parcialmente en medios digitales (*formato electrónico en formato PDF*) “La Tesis” por un periodo de (*10 años*) contado a partir de la fecha de la presente autorización, dicho periodo se renovará automáticamente en caso de no dar aviso expreso a “El IPN” de su terminación.

En virtud de lo anterior, “El IPN” deberá reconocer en todo momento mi calidad de autor de “La Tesis”.

Adicionalmente, y en mi calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de “La Tesis”, manifiesto que la misma es original y que la presente autorización no contraviene ninguna otorgada por el suscrito respecto de “La Tesis”, por lo que deslindo de toda responsabilidad a El IPN en caso de que el contenido de “La Tesis” o la autorización concedida afecte o viole derechos autorales, industriales, secretos industriales, convenios o contratos de confidencialidad o en general cualquier derecho de propiedad intelectual de terceros y asumo las consecuencias legales y económicas de cualquier demanda o reclamación que puedan derivarse del caso.

Ciudad de México a 24 de Noviembre del 2016.

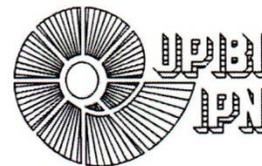
Atentamente



Armando Montoya García



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA

ACTA DE TRABAJO ESCRITO

En la Ciudad de México el día 24 de Noviembre del 2016, siendo las 11:30 se reunieron los integrantes de la Comisión de Evaluación para Opción Curricular con el fin de revisar el trabajo escrito titulado: "Producción de un nanocuerpo quimérico contra el virus del papiloma humano en *E. coli* y su purificación" que presenta el alumno Armando Montoya García con número de boleta 2013620247, aspirante a Ingeniería Biotecnológica

Después de intercambiar opiniones los integrantes de la Comisión de Evaluación manifiestan APROBAR EL TRABAJO ESCRITO, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes para la opción curricular de titulación.

COMISIÓN REVISORA.



Dr. Edgar Salgado Manjarrez
Director



Biol. Gerardo Rodríguez Muñoz



M. en C. César Agustín Jiménez
Sierra



M. en C. Jonás Martínez Limón
Director de Programa Académico

AGRADECIMIENTOS

El presente Proyecto de investigación se realizó en el Laboratorio de Bioingeniería de posgrado de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI) del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección y supervisión del Dr. Edgar Salgado Manjarrez.

Agradezco al Instituto Politécnico Nacional (IPN) por permitirme realizar mis estudios de Licenciatura y brindarme las herramientas para mi formación profesional.

A mis padres que siempre me han apoyado y han sido parte de mi educación y formación; sin ellos no habría llegado a donde estoy ahora.

Al Dr. Edgar Salgado Manjarrez por guiarme en este proceso de formación en el área de investigación y por su paciencia a lo largo del desarrollo del proyecto.

A la Ing. Jessica Álvarez Ramírez por su apoyo, comprensión y paciencia a lo largo de sus enseñanzas para la realización del proyecto.

Producción de un nanocuerpo quimérico contra el virus del papiloma humano en *E. coli* y su purificación.

RESUMEN

Más del 99% de tumores cervicales son ocasionados debido al DNA del Virus del Papiloma Humano (HPV), pero existen otros tumores relacionados con este virus, así que se estima que el HPV es el responsable de causar el 5.2% de todos los cánceres. El diagnóstico rápido y tratamientos para tratar las infecciones por el HPV son importantes, es por ello que varios métodos han sido empleados para resolver la inmunogenicidad de anticuerpos que eligen como blanco los serotipos del HPV.

Los nanocuerpos® (V_HH) son las biomoléculas anticuerpo derivadas más pequeñas en dimensiones en el rango de nanómetros (15-60 kDa), y presentan notables propiedades como alta estabilidad y solubilidad, además por su pequeño tamaño pueden penetrar rápidamente dentro de un tejido siendo herramienta eficiente para ciertas terapias.

Dada su importancia en área clínica, en este proyecto se propone la producción de un nanocuerpo quimérico que reconoce la proteína L1 del HPV, usando la bacteria *Escherichia coli* como sistema de expresión para evaluar su construcción y purificación para dirigir la producción en los cloroplastos de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Para lograr este objetivo, se insertó el gen que codifica para una proteína recombinante quimérica de fusión, de aproximadamente 45 kDa, en el vector pET28b. La proteína de fusión consistió en el nanocuerpo, dos etiquetas de purificación (NanoTag₉ y 6xHis) y una proteína fluorescente señaladora, mCherry. La construcción permitió la expresión del nanocuerpo recombinante en *E. coli* BL21(DE3) y su purificación usando una columna Ni-NTA. La purificación del nanocuerpo se confirmó con SDS-PAGE correspondiendo con el tamaño de 45 kDa que se esperaba y con western blot usando anticuerpos Anti-His-HRP que reconocen la etiqueta 6xHis comprendida en la proteína recombinante.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	iii
Resumen	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ABREVIATURAS.....	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Anticuerpos y Nanocuerpos (V _H H).....	1
1.2. Ventajas y Desventajas del uso de los V _H H	2
1.3. El virus del papiloma humano	3
1.4. Producción de proteínas recombinantes en <i>Escherichia coli</i>	5
1.5. Purificación de proteínas recombinantes: Uso de etiquetas.	8
2. JUSTIFICACIÓN.....	10
3. OBJETIVOS.....	11
3.1. Objetivo General.....	11
3.2. Objetivos Específicos	11
4. MATERIALES Y MÉTODoS	12
4.1. Expresión de la proteína recombinante en <i>E. coli</i>	12
4.1.1. Cepa <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3).	12
4.1.2. Vector pET28b (Novagen, EUA).....	13
4.1.3. Medio de cultivo	14
4.1.4. Transformación de <i>E. coli</i>	14
4.1.5. Fermentación de <i>E. coli</i>	15
4.1.6. Lisis celular	15
4.1.7. Purificación de la proteína recombinante	15
4.1.8. Extracción de la proteína total de <i>E. coli</i>	16
4.2. Análisis de la expresión de la proteína recombinante	16
4.2.1. Determinación de la concentración de proteína.....	16

4.2.2.	SDS-PAGE	17
4.2.3.	Transferencia de proteínas	18
4.2.4.	Western blot	19
5.	PRODUCCIÓN DEL NANOCUERPO EN <i>E. coli</i>	20
5.1.	Construcción de pET28b para la transformación de <i>E. coli</i>	20
5.2.	Expresión del nanocuerpo quimérico en <i>E. coli</i>	21
6.	RECUPERACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL NANOCUERPO QUIMÉRICO.....	23
6.1.	Purificación del nanocuerpo quimérico de <i>E. coli</i> por la etiqueta 6xHis.....	23
7.	DISCUSIÓN	28
8.	CONCLUSIONES	30
9.	PERSPECTIVAS	31
10.	REFERENCIAS.....	32
11.	ANEXOS.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de los anticuerpos que están de forma natural en suero de camellos.	2
Figura 2. Virus del Papiloma Humano (HPV).	4
Figura 3. Mapa del plásmido pET28b (+).	14
Figura 4. Concentraciones de BSA de la curva estándar.	17
Figura 5. Representación esquemática de la construcción usada en la transformación de <i>E. coli</i>	20
Figura 6. Representación esquemática de la construcción del vector de expresión pET28b usando la construcción (Nc)	21
Figura 7. Expresión de la proteína recombinante en <i>E. coli</i> BL21(DE3). Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).	22
Figura 8. Pastilla bacteriana del cultivo de <i>E. coli</i> BL21(DE3).	23
Figura 9. Cromatografía de afinidad con la columna Ni-NTA para purificar la proteína recombinante	24
Figura 10. Purificación de la proteína recombinante que contiene el nanocuerpo quimérico en la columna Ni-NTA. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) con tinción azul de Comassie	25
Figura 11. Purificación de la proteína recombinante que contiene el nanocuerpo quimérico en la columna Ni-NTA. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) con tinción azul de Comassie	26
Figura 12. Western blot de la proteína recombinante que contiene el nanocuerpo	27

ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µM	Micromolar
C _H	Dominio de la Inmunoglobulina de cadena pesada H
DO	Densidad óptica
Fab	Fragmento de unión a antígeno
Fc	Fragmento cristalizable
His	Histidina
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
kDa	Kilodaltones
L	Litro
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mM	Milimolar
nm	Nanometros
NTA	Ácido nitrilotriacético
pH	Potencial de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
ScFv	Fragmento variable de una cadena
SDS	Dodecilsulfato de sódio
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina
V	Volts
RNA	Ácido ribonucleico

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Anticuerpos y Nanocuerpos (V_{HH})

La estructura general de la inmunoglobulina-Y (IgG) está formada por dos cadenas pesadas de polipéptidos (H) idénticas y dos cadenas ligeras de polipéptidos (L) también idénticas que están altamente conservadas en mamíferos (Padlan, 1994) (Figura 2.1.1). La cadena L de esas inmunoglobulinas comprende dos dominios, mientras que la cadena H comprende cuatro dominios. La secuencia del dominio N-terminal de las cadenas polipeptídicas H y L varía entre anticuerpos (designadas como dominios variables, V_H y V_L). El emparejado de los dominios V_H - V_L constituye el fragmento variable (F_V) que reconoce el antígeno. Las secuencias restantes H y L son más conservadas (y se abrevian como C_H y C_L , respectivamente). Las dos últimas regiones C_H son importantes para el reclutamiento de células inmunes (como macrófagos y las células asesinas naturales NK) o para funciones efectoras (como la activación del sistema del complemento) (Muyldermans, 2013).

Una excepción notoria de esta estructura convencional de la IgG en mamíferos es encontrada en el suero de los camélidos (Hamers-Casterman, et al., 1993). Además de los anticuerpos convencionales, este suero posee anticuerpos IgG particulares, conocidos como Anticuerpos de Cadena Pesada (hcAbs), los cuales no tienen la cadena polipeptídica ligera (L). En su región N-terminal, la cadena H de la proteína homodimérica contiene un dominio variable referido como V_{HH} , el cual sirve para asociarse con su antígeno afín sin requerir el dominio par. Estos hcAbs tampoco tiene el dominio C_{H1} , el cual en anticuerpos convencionales se asocia con la cadena ligera y con menor grado interacciona con el dominio V_H . La región V_{HH} en un hcAb es el equivalente estructural y funcional del fragmento Fab (Fragmento de unión a antígeno, por sus siglas en inglés *antigen-binding fragment*) de los anticuerpos convencionales (Figura 1) (Muyldermans, 2013).

El dominio variable, designado como V_{HH} , es la biomolécula anticuerpo-derivada más pequeña con dimensiones en el rango de nanómetros (15-60 kDa) es también conocido como nanocuerpo® Nb (por sus siglas en inglés *Nanobody*®) o anticuerpo de un solo dominio (sdAb) (Muyldermans, 2013; Wesolowki, et al., 2009) y es actualmente ocupada en aplicaciones médicas y biotecnológicas industriales (Saarens, et al., 2008).

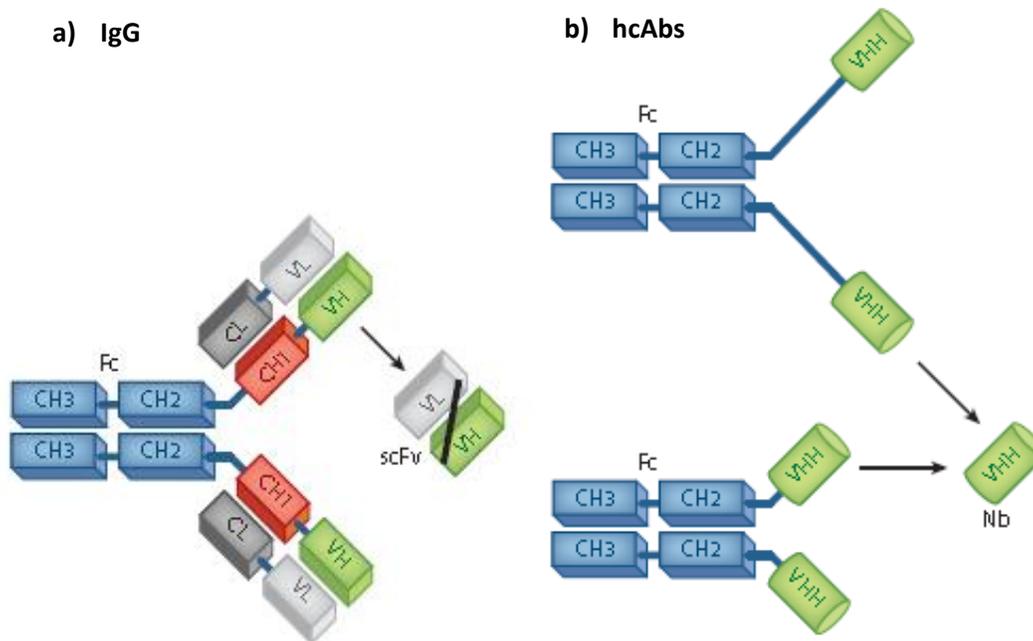


Figura 1. Representación esquemática de los anticuerpos que están de forma natural en suero de camellos: (a) Anticuerpos convencionales (IgG) que contienen dos cadenas ligeras L (y los dominios V_L y C_L) y dos cadenas pesadas H (Compuestas de V_H , C_{H1} , bisagra y los dominios C_{H2} , C_{H3}) (b) y dos tipos de Anticuerpos de Cadena Pesada (hcAbs) los cuales contienen solo la cadena pesada H, cada cadena H contiene V_{HH} , bisagra y los dominios C_{H2} , C_{H3} . Los dominios C_{H2} , C_{H3} pertenecen a la parte Fc. En IgG, los primeros dos dominios de la cadena H y la cadena L pertenecen al fragmento Fab. El fragmento intacto funcional de unión a antígeno más pequeño que puede ser generado desde anticuerpos convencionales, consiste del par V_H - V_L y la unión del oligopéptido, es conocida como scFv. Por otro lado, el fragmento intacto funcional de unión a antígeno más pequeño de los hcAbs es el dominio único V_{HH} , también conocido como nanocuerpo (Nb). (Muyldermans, 2013).

1.2. Ventajas y Desventajas del uso de los V_{HH}

El análisis de las secuencias que codifican para los V_{HH} ha revelado muchas características estructurales particulares (Hamers-Casterman, et al., 1993). De forma similar a los dominios convencionales V_H , los V_{HH} contienen cuatro regiones estructurales (F_R) que forman la estructura del núcleo del dominio de la inmunoglobulina y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR) que están involucradas en la unión a antígeno (Harmsen & De Haard, 2007). En comparación con el dominio humano V_H , las F_R de los V_{HH} muestran una secuencia homóloga de más del 80%, y ambas estructuras 3D pueden ser superpuestas (Muyldermans, 2001). Mientras los anticuerpos comunes de tamaño completo son de 150-

160 kDa y requieren ensamblaje de múltiples fragmentos de las cadenas pesada y ligera por medio de enlaces bisulfuro (Dolk, et al., 2005).

Los dominios V_HH, al ser un único dominio, tienen la ventaja de ser funcionales incluso a temperaturas altas, como 90°C y también se solubilizan fácilmente en soluciones acuosas. Esta alta estabilidad aparente es principalmente atribuida a su eficiente replegado después de una desnaturalización química o térmica (Harmsen & De Haard, 2007). Los V_HH también pueden reconocer antígenos que no son normalmente reconocidos por anticuerpos convencionales como sitios activos de enzimas y cierto epítomos conservados, facilitando su uso como inhibidor de enzima o en diagnóstico de infecciones por el género *Trypanosoma*. Esta habilidad ha sido atribuida a su pequeño tamaño de 15-60 kDa (De Genst, et al., 2006). Por esta misma propiedad, los V_HH pueden penetrar rápidamente dentro de un tejido y son una herramienta eficiente para la terapia tumoral dirigida (Muyldermans, 2001). Además, esta característica, resulta ser ventajosa para dirigir los V_HH específicamente a tumores que expresan lisozima y producen metástasis (Cortez-Retamozo, et al., 2002) así como usarlos para neutralizar los efectos locales del envenenamiento causado por mordeduras de serpientes (Harrison, et al., 2006).

Una desventaja de los V_HH es su falta de funciones codificadas por el fragmento Fc, tales como el reclutamiento de funciones efectoras implicadas en la eliminación de patógenos por fagocitosis. Además, los V_HH son rápidamente removidos de la circulación de los mamíferos aproximadamente a las 2 horas, mientras el tiempo de vida medio de anticuerpos completos es de aproximadamente 3 semanas. Esto es primordialmente causado por el pequeño tamaño de los V_HH (15-60 kDa) resultado en su paso por el riñón y su eliminación por la orina. Esta desventaja de los V_HH limita su uso en aplicaciones terapéuticas como el tratamiento de infecciones o enfermedades inflamatorias. (Harmsen, et al., 2005).

1.3. El virus del papiloma humano

Más del 99% de tumores cervicales son ocasionados debido al DNA del Virus del Papiloma Humano (HPV). Otros tumores relacionados con este virus, como el vaginal, el de vulva, el de pene, el anal y orofaríngeo, representan un 0.7% adicional de todos los sitios de cáncer tanto en hombre como mujeres, así que el HPV está estimado de ser el responsable de causar el 5.2% de todos los cánceres y también puede ser considerado como el agente más común conocido en ser sexualmente transmitido (Parkin, et al., 2008).

Actualmente se conocen más de 80 genotipos de HPV y son generalmente clasificados de acuerdo a su potencial de inducir transformaciones malignas. 16 genotipos de HPV son considerados de “alto riesgo”, destacando el HPV-16 y el HPV-18, porque son detectables en carcinomas y displasias. Otros 5 genotipos del HPV como el HPV-31, HPV-35 y el HPV-52 son considerados de “riesgo-intermedio” porque son más comunes en lesiones de displasia leves que en carcinomas (Motoyama, et al., 2004).

El virus del Papiloma humano (HPV) consiste de una cadena doble de DNA pequeña sin envoltura y una cápside icosaédrica (Modis, et al., 2002). El genoma del HPV es aproximadamente de 8 kb y codifica para 6 proteínas tempranas (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) y 2 proteínas tardías (L1 y L2). Los genes tardíos codifican para proteínas estructurales que forman la cápside icosaédrica viral que consiste de 72 pentámeros (Figura 5). Ha sido demostrado que en la neutralización viral por los anticuerpos está presente la proteína principal de la cápside L1. Tanto los epítomos lineales como los conformacionales han sido identificados en la superficie del HPV-16 y más de tres regiones L1 contienen epítomos lineales. Estos resultados sugieren que los epítomos conformacionales de las células B inducen anticuerpos neutralizantes. Por el contrario, los epítomos de reacción cruzada son epítomos lineales y en su mayoría no neutralizantes. Se ha sugerido que tales epítomos lineales no están expuestos en la superficie (Chen, et al., 2000).

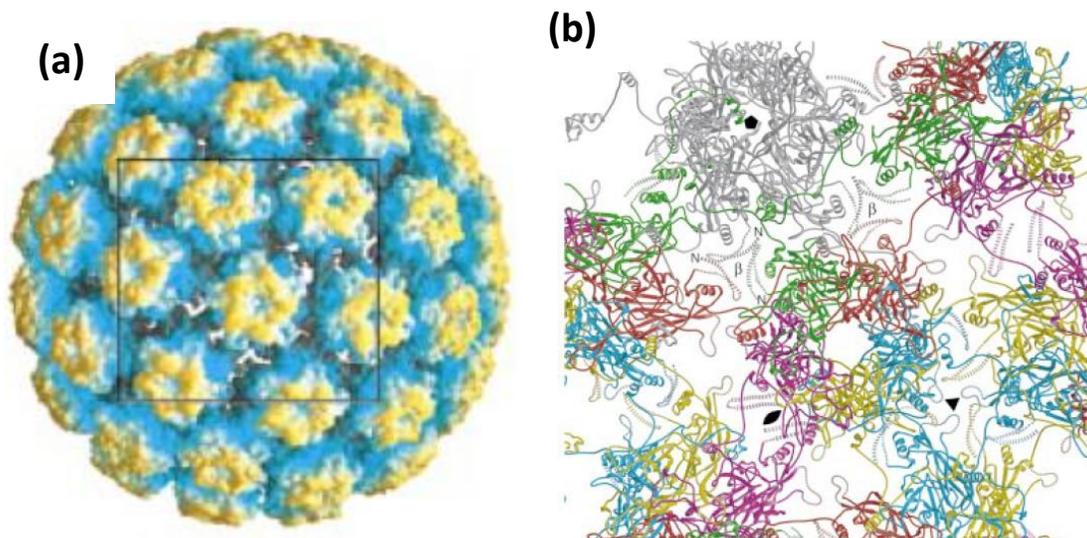


Figura 2. Virus del Papiloma Humano (HPV); (a) Vista de la superficie del modelo atómico del HPV, coloreado de acuerdo a la distancia desde el centro de la cápside. La caja indica el área que se muestra en la Figura 5B. (b) Un acercamiento de la superficie viral, donde se muestran las proteínas L1 unidas en forma pentamérica (Modis, et al., 2002).

Las proteínas L1 del HPV son capaces de ensamblarse a si mismas *in vitro* en partículas similares al virus (VLP). Las VLP son inmunogénicas en humanos e inducen anticuerpos neutralizantes. *Gardasil®* es una vacuna profiláctica que está compuesta de VLPs formada por autoensamblaje de las proteínas recombinantes de la cápside L1 del HPV-6, HPV-11, HPV-16 y HPV-18 (Kemp, et al., 2011). Por otro lado, existen algunos anticuerpos monoclonales (MAbs) que se unen con la proteína L1 del HPV. Éstos fueron analizados en su afinidad de unión con la proteína L1 y epítomos L1 lineales en partículas de HPV-11 y HPV-16 indicando que los MAbs se unen con la proteína L1 bloqueando la infección viral (Culp, et al., 2007).

1.4. Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*.

Las aplicaciones más importantes de las proteínas recombinantes son: (1) inmunización, (2) estudios bioquímicos, (3) análisis de tres dimensiones de proteínas y (4) usos biotecnológicos y terapéuticos. La producción de proteínas recombinantes implica la clonación del gen apropiado en un vector de expresión bajo el control de un promotor. Sin embargo, la expresión eficiente del gen recombinante depende de una variedad de factores como la expresión de señales (tanto a nivel de transcripción como de traducción), el correcto plegamiento de la proteína y las características de crecimiento celular (Schumann & Ferreira, 2004). El primer paso para la producción de proteínas recombinantes es tener el gen que codifica para la proteína a producir; luego el gen es insertado en el sistema de expresión elegido. Hay una gran variedad de sistemas de expresión disponibles. Las proteínas recombinantes pueden ser expresadas en cultivos celulares de bacterias, levaduras, mohos, algas, células de mamíferos, plantas o insectos, o por vía de plantas o animales transgénicos. La calidad de la proteína, funcionalidad, velocidad de producción y rendimiento son los factores más importantes a considerar cuando se elige el sistema de producción para proteínas recombinantes (Demain & Vaishnav, 2009).

El panorama de proteínas recombinantes en sistemas microbianos tiene mucho potencial en aplicaciones biotecnológicas (Schumann & Ferreira, 2004). No hay duda que la producción de proteínas recombinantes en sistemas bacterianos ha revolucionado la bioquímica, pues la habilidad de expresar y purificar proteínas recombinantes en una gran cantidad permite su caracterización bioquímica para su uso en procesos industriales y el desarrollo de bienes comerciales (Rosano & Ceccarelli, 2014).

Escherichia coli es uno de los organismos de elección para la producción de proteínas recombinantes. Su uso como fábrica celular está bien establecido y ésta se ha convertido en la plataforma de expresión más popular (Rosano & Ceccarelli, 2014). Los genes de *E. coli* son por

mucho los mejores entendidos que cualquiera otro microorganismo. Progresos recientes en el entendimiento fundamental de la transcripción, traducción y plegado de proteínas en *E. coli*, junto con la disponibilidad de herramientas genéticas mejoradas, está haciendo a esta bacteria más valiosa que cualquiera para la expresión de proteínas eucariotas complejas. Su genoma puede ser modificado de manera rápida y precisa, mientras que el número de copias del plásmido puede ser fácilmente alterado. Así mismo, *E. coli* puede acumular proteínas recombinantes por arriba del 80% de su peso seco y sobrevive a una variedad de condiciones ambientales (Demain & Vaishnav, 2009).

Así como la producción en *E. coli* presenta varios beneficios, también tiene inconvenientes. Sin embargo, se han propuesto soluciones para tener una expresión eficiente de la proteína recombinante, por ejemplo altas densidades celulares resultan en toxicidad debido a la formación de acetato; pero esto se puede evitar controlando el nivel de oxígeno durante la fermentación. El sistema *E. coli* produce proteínas sin modificar, es decir sin glicosilación, lo cual es una razón por la que los anticuerpos fallan en reconocer proteínas de mamíferos. También, hay proteínas que son producidas como cuerpos de inclusión las cuales, a veces, son inactivas e insolubles, usualmente tienen enlaces disulfuro intra e intermoleculares no nativos y cisteínas libres inusuales. Para obtener proteínas activas, éstas tienen que ser solubilizadas por desnaturalizantes los cuales despliegan la proteína y los puentes disulfuro son eliminados usando agentes reductores (Fischer, et al., 1993). Otro método que reduce la formación de cuerpos de inclusión consiste en bajar la temperatura de crecimiento de 37°C a 30°C (Schein, 1989); además la secreción de proteínas dentro del espacio periplásmático o en el medio de cultivo induce el correcto plegamiento de la proteína (reduciendo los cuerpos de inclusión) y facilita la purificación de la proteína (Demain & Vaishnav, 2009). *E. coli* es usada para producción masiva de muchas proteínas comerciales, además de que es excelente para expresar proteínas no glicosiladas funcionales. A principios de 1993, los procesos recombinantes en *E. coli* fueron responsables de cerca de 5 millones de dólares en valor de productos como insulina, hormona de crecimiento humana, interferón α , β , γ y el factor estimulante de colonias de granulocitos (Swartz, 1996).

Otros sistemas bacterianos útiles para la producción de proteínas recombinantes son los bacilos Gram positivos. Estos son principalmente preferidos por la expresión de enzimas como proteasas (para detergentes) y amilasas (para degradar el almidón). El género *Bacillus* tiene la ventaja de ser fácilmente manipulado genéticamente al ser un sistema bien caracterizado. Además, los genomas de *Bacillus subtilis* y *B. licheniformis* han sido secuenciados y no se

encontraron genes que puedan producir exotoxinas y endotoxinas. Por otro lado, la secreción de las proteínas deseadas en el medio de fermentación, resulta en un proceso de recuperación sencillo, eliminando la necesidad de lisis celular o procesos de técnicas químicas. Esto hace la recuperación relativamente más eficiente (Demain & Vaishnav, 2009).

Las levaduras, son organismos unicelulares fúngicos eucarióticos, que son comúnmente usados para producir proteínas recombinante que no son bien producidas en *E. coli*, debido a problemas relacionado con el plegamiento o la necesidad de glicosilación (Demain & Vaishnav, 2009). Las cepas de levaduras están bien caracterizadas genéticamente y se conoce que pueden realizar muchas modificaciones post-traduccionales además se adaptan fácilmente a procesos de fermentación. Las dos cepas de levadura más utilizadas son *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*.

S. cerevisiae ofrece ciertas ventajas sobre las bacterias como sistema de expresión. (1) Esta levadura tiene una larga historia en el uso de fermentaciones industriales, (2) puede secretar proteínas heterólogas dentro del medio extracelular cuando las señales apropiadas han sido ligadas a los genes estructurales y (3) puede realizar glicosilación de proteínas (Gellissen, et al., 1992). Los productos que se encuentran en el mercado los cuales son expresadas en *S. cerevisiae* son la insulina, el antígeno de superficie de hepatitis B, urato oxidasa, el factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF), hirudina y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (Demain & Vaishnav, 2009). Por otro lado, *P. pastoris* es capaz de producir proteínas glicosiladas y con puente disulfuro, la cual es la mayor ventaja que *Pichia* presenta sobre *E. coli* y una ventaja sobre otras levaduras en producir proteínas recombinantes es su gran habilidad de secretar proteínas. Adicionalmente, *Pichia* es capaz de crecer en medio que contiene solo una fuente de carbono y una de nitrógeno, lo que la hace adecuada para aplicaciones de marcaje isotópico (Choi, et al., 2003) *P. pastoris* produce altos niveles de proteínas de mamífero recombinantes en medio extracelular. Un precursor de la insulina fue producido con una concentración de 1.5 g/L (Wang, et al., 2001).

Las algas han sido usadas para el consumo humano y animal. Recientemente, las algas se han cultivado para la producción de ácidos grasos, metabolitos secundarios como pigmentos, colorantes y compuestos con actividades antitumoral, viral y anti-fúngica. Las principales especie en ser cultivadas para el consumo animal y humano son *Chlorella* y *Spirulina*, mientras *Dunaliella salina* y *Haematococcus pluvialis* han sido cultivadas para la extracción de β -carotenos y astaxantina, respectivamente (Borowitzka, 1999). Así mismo *Chlamydomonas*

reinhardtii, un alga que ha sido usada como un modelo de estudio de fotosíntesis, motilidad celular, fototaxis y otros procesos metabólicos y genéticos (Harris, 2001), es una de las especies de algas que ha sido genéticamente modificada en el núcleo, la mitocondria y el cloroplasto, siendo este último el que ha recibido atención considerable, principalmente por demostrar que la acumulación de proteínas recombinantes en este organelo es factible (Almaraz Delgado, et al., 2014) pues la tecnología de transformación en cloroplastos ha sido más adecuada para la producción de inmunotoxinas (Tran Miller, et al., 2013) y anticuerpos, los cuáles han sido difíciles de producir en otros sistemas y aunque no existe glicosilación de proteínas en los cloroplastos de *C. reinhardtii*, se han encontrado casos exitosos de anticuepos funcionales. Por ejemplo, Mayfield *et. al.* (2003) ha expresado un anticuerpo monoclonal que reconoce una glicoproteína del Virus del Herpes simple D (HSV8) en el cloroplasto de *C. reinhardtii*; el anticuerpo forma puentes disulfuro y se ensamblan como dímeros en el cloroplasto (Mayfield, et al., 2003).

En otro caso de anticuerpos producidos en los cloroplastos de *C. reinhardtii*, se encuentra el anticuerpo monoclonal en contra de una proteína que *Bacillus anthracis*; este anticuerpo mostró que a pesar de la falta de glicosilación, el cloroplasto produjo un anticuerpo que tenía las mismas propiedades de unión que el anticuerpo producido en líneas celulares de mamífero (Tran, et al., 2009). También Barrera *et. al* (2015) ha producido un nanocuerpo® (V_HH) en los cloroplastos de *C. reinhardtii* que es capaz de neutralizar la neurotoxina botulínica (BoNT) de *Clostridium botulinum* y proteger las neuronas primarias de una rata de la intoxicación (Barrera, et al., 2015).

Producir compuestos activos biológicos en *C. reinhardtii* tiene muchas ventajas respecto a producirlos en otros organismos; las más importantes son: a) los compuestos están libres de patógenos humanos; b) su tasa de crecimiento es más rápida en comparación con plantas y células animales; c) es un organismo Generalmente Reconocido como Seguro GRAS (por sus siglas en inglés *Generally Recognized as Safe*) por la Administración de Alimentos y Medicamentos FDA (por sus siglas en inglés *Food and Drug Administration*) de los Estados Unidos de América; d) los cultivos celulares pueden crecer en biorreactores, lo que reduce el riesgo de dispersión de transgenes (Almaraz Delgado, et al., 2014).

1.5. Purificación de proteínas recombinantes: Uso de etiquetas.

Las etiquetas peptídicas de afinidad de han convertido en una herramienta muy popular para purificar proteínas recombinantes y proteínas nativas complejas por diversas razones. Éstas

pueden proporcionar la purificación de hasta mil veces de extractos crudos, sin pasos previos para remover ácidos nucleicos u otro material celular. También, las condiciones suaves de elución empleadas hacen de las etiquetas de afinidad útiles para purificar proteínas individuales y especialmente, proteínas complejas. Así mismo, las etiquetas de afinidad permiten purificar diversas proteínas usando protocolos generales en comparación con procedimientos altamente personalizados asociados con cromatografía convencional (Lichty, et al., 2005). Ejemplos de etiquetas peptídicas pequeñas comunes son: poli-Arg-, FLAG-, poly-His-, c-Myc-, S- y StrepII-tag (Terpe, 2003). Desde que los anticuerpos comerciales están disponibles para todas las etiquetas antes mencionadas, el etiquetado de proteínas puede ser detectado por Wester blot a lo largo de los ensayos de expresión, lo cual es extremadamente provechoso cuando los niveles de la proteína deseada no son los suficientemente altos para ser detectado por SDS-PAGE (Rosano & Ceccarelli, 2014).

La mayoría de las proteínas terapéuticas disponibles y las etiquetas peptídicas de afinidad fueron desarrolladas dentro de los últimos 20 años y pueden ser categorizadas en tres clases dependiendo de la naturaleza de la etiqueta de afinidad y su objetivo. La primera clase de etiquetas de afinidad usan péptidos o proteínas de fusión que se unen a ligando de moléculas pequeñas unidas a un soporte sólido. Por ejemplo la etiqueta de afinidad poly-His- forma fácilmente enlaces coordinados con los iones de metales de transición inmovilizados, como Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , pero Ni^{2+} es la más comúnmente utilizada. En la segunda clase de etiquetas de purificación, se encuentran los péptidos que se unen a una proteína inmovilizada en cromatografía, como el péptido que se une a la calmodulina y la StrepII-tag es cual es un péptido pequeño que se une a la Estreptavidina y ha sido usado para la purificación y detección de proteínas; tiene la ventaja sobre otras etiquetas de que no interfiere con la función biológica de la proteína etiquetada, además existe un gran número de conjugados de Estreptavidina que están comercialmente disponibles. La tercera clase de etiquetas de afinidad pueden ser consideradas una derivación de la segunda clase donde la pareja de unión a la proteína atrapada en la resina es un anticuerpo el cual reconoce un epítipo péptido específico. Como por ejemplo el péptido FLAG, que son cortos motivos lineales de reconocimiento, que raramente afectan a las propiedades de la proteína heteróloga de interés (Lichty, et al., 2005; Kimple, et al., 2015; Lamla & Erdmann, 2004).

2. JUSTIFICACIÓN

El virus del papiloma humano (HPV) es la principal causa de cáncer cervicouterino en países desarrollados y también puede ser considerado como el agente más común conocido en ser sexualmente transmitido, es por ellos que varios métodos se han empleado para diagnosticar y tratar las infecciones del HPV.

Los nanocuerpos® (V_HH) son los fragmentos más pequeños de anticuerpos de origen natural que tienen un solo dominio con su sitio de unión a antígeno comprometido en un único dominio. Los V_HH tienen notables propiedades que pueden proveer nuevas oportunidades para propósitos terapéuticos y de diagnósticos. Este anticuerpo de un solo dominio sigue siendo funcional incluso a temperaturas altas, como 90°C y es también fácilmente soluble en soluciones acuosas. Por su pequeño tamaño, este anticuerpo puede penetrar rápidamente dentro de un tejido y es una herramienta eficiente para la terapia tumoral dirigida, además los V_HH tienen una unión específica de alta afinidad con su antígeno y una alta homología con el dominio humano VH3.

Por las ventajosas propiedades terapéuticas de los V_HH, en el presente proyecto se propone la expresión de un nanocuerpo® (V_HH) quimérico que reconoce la proteína L1 del HPV en la bacteria *E. coli*, con la finalidad de evaluar su construcción y purificación para dirigir la producción del V_HH en los cloroplastos de *Chlamydomonas reinhardtii*., pues existen reportes de V_HH funcionales, expresados en cloroplastos de *C. reinhardtii*., a pesar de no estar glicosilados.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

- Producir y purificar un nanocuerpo quimérico usando *E. coli* y etiquetas de purificación.

3.2. Objetivos Específicos

- Transformar *E. coli* con plásmido pET28b.
- Recuperar proteínas totales de *E. coli*
- Purificar el nanocuerpo usando etiquetas de separación: 6xHis.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Expresión de la proteína recombinante en *E. coli*

4.1.1. Cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3).

Se utilizó la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) como cepa hospedera para la transformación del plásmido y producción de la proteína recombinante. El genotipo de la cepa se muestra en la tabla 1 y la descripción de ese genotipo se muestra en la tabla 2.

Tabla 1. Genotipo de *E. coli* BL21 (DE3) utilizada para la transformación (Invitrogen, EUA).

BL21(DE3)	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB-mB-) <i>galdcmrne131</i> (DE3)
-----------	---

Tabla 2. Descripción del genotipo de *E. coli* BL21(DE3) utilizada para la transformación (Invitrogen, EUA).

Genotipo	Descripción
<i>ompT</i>	Indica que <i>E. coli</i> carece una proteasa de membrana externa, reducido la degradación de proteínas heterólogas y ayudando a recuperar las proteínas recombinantes intactas.
<i>dcm</i>	Este gen ayuda para propagar DNA para la escisión con ciertas enzimas de restricción.
F'	Plásmido auto-transmisible utilizado para la generación de DNA monocatenario cuando está infectado con el fago M13; puede contener un marcador de resistencia para permitir el mantenimiento y con frecuencia llevara los genotipos <i>lacI</i> y <i>lacZΔM15</i> .
DE3	Codifica para la RNA polimerasa T7 bajo el control del promotor <i>lacUV5</i> . Los plásmidos transformados que contienen la expresión impulsada por el promotor T7 se reprimen hasta que se induce la expresión con IPTG.
<i>rne131</i>	Gen que ofrece una mayor estabilidad del RNAm, reduciendo los niveles de RNasa natural y la degradación de RNAm, lo que aumenta la estabilidad de los transcritos de RNAm y la producción de proteínas.
<i>hsd</i>	Mutación en el sistema de metilación y restricción que permite a <i>E. coli</i> reconocer DNA extraños. El genotipo <i>hsd</i> hace eficiente la transformación de DNA generada por reacciones de PCR.

4.1.2. Vector pET28b (Novagen, EUA)

Este es un vector de 5368 pb desarrollado para la clonación y expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*, usando el promotor del bacteriófago T7 que es inducido por la ARN polimerasa de *E. coli* BL21 (DE3). Los sistemas de expresión basados en la RNA polimerasa del bacteriófago T7 tienen la mayor ventaja el que, una vez inducido el promotor T7, la maquinaria de transcripción de *E. coli* no puede competir con la RNA polimerasa del bacteriófago y casi toda la transcripción de la célula tiene lugar a partir del promotor T7. El producto deseado puede comprender más de un 50% de la proteína celular total de 6 a 12 horas después de la inducción. El vector pET28b incluye una cola de histidinas, y la secuencia de reconocimiento de la trombina en el extremo N-terminal de la región de expresión (Figura 3); la inserción de dichos aminoácidos, facilitan la detección y posterior purificación de la proteína recombinante. También contiene el gen de resistencia a kanamicina (*kanR*) y el gen que codifica para la proteína que inhibe la expresión de genes que codifican a las proteínas involucradas en el metabolismo de lactosa en bacterias (*lacI*). Una vez establecido en las células hospederas, los plásmidos son propagados dentro de éstas que contienen una copia cromosomal del gen de la polimerasa RNA T7 bajo el control de *lacUV5*, y la expresión es inducida por la adición de IPTG.

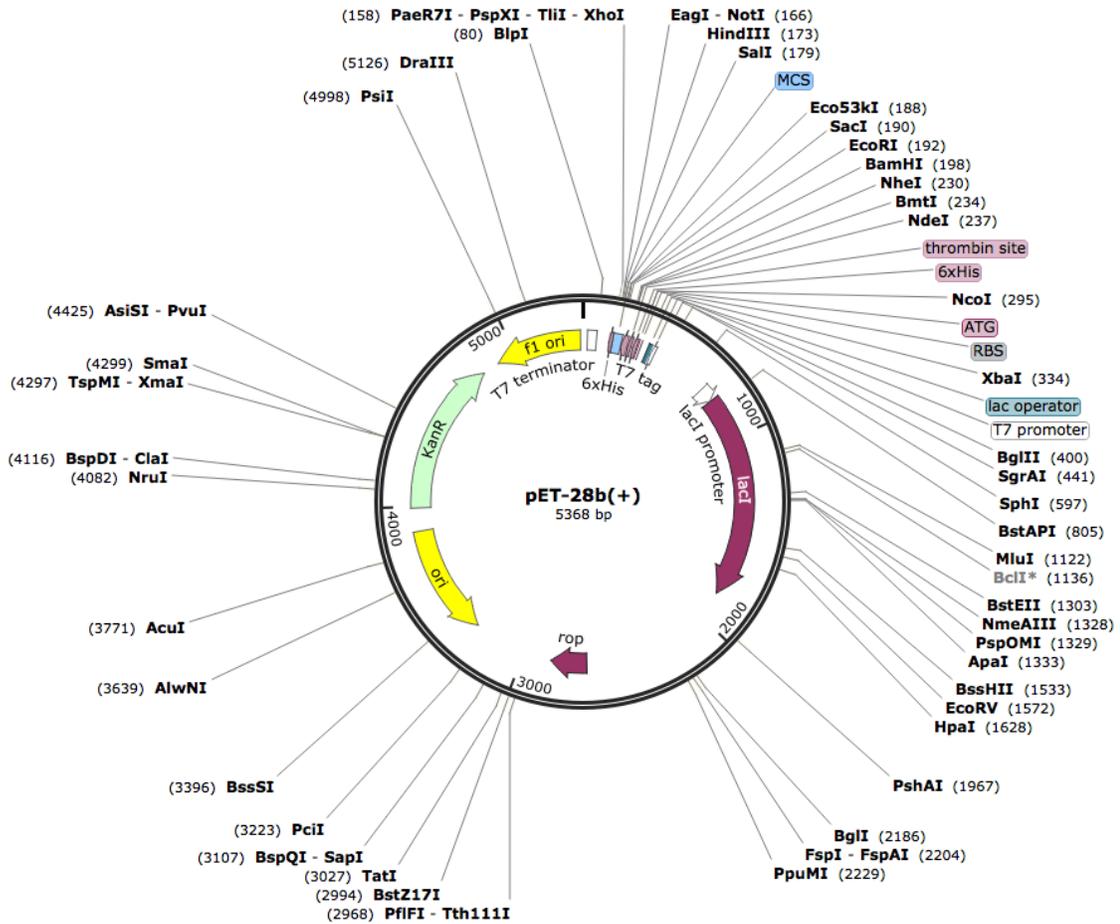


Figura 3. Mapa del plásmido pET28b (+).

4.1.3. Medio de cultivo

En la preparación del medio LB se utilizó 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl, la solución se aforó a 1 L con agua destilada. El medio fue esterilizado en autoclave por 15 min a 121°C, 15 psig.

4.1.4. Transformación de *E. coli*

Se agregó 4 µL del vector pET28b con el gen que codifica para la proteína recombinante a células *E. coli* BL21 (DE3) en alícuotas, se mezcló cuidadosamente y los tubos se incubaron en hielo durante 20 min, transcurrido este tiempo se transfirieron 100 µL de las células competentes se sembraron por extensión en varilla en placa de medio LB selectivo con kanamicina 50 µg/mL. Se mantuvieron las placas a temperatura ambiente hasta que el líquido

fue absorbido por el agar. Las placas de incubaron a 37°C por un periodo de 16 h hasta la presencia de colonias transformadas de 1 a 3 mm de diámetro.

4.1.5. Fermentación de *E. coli*

Se tomó una colonia de la placa con medio LB con células transformadas y se inoculó en un tubo de vidrio con 5 mL de medio LB conteniendo 50 µg/mL de Kanamicina, este tubo se dejó incubando 16 h a 37°C con agitación vigorosa. Posteriormente, los 5 mL del tubo se inocularon en un matraz de 500 mL con 250 mL de medio LB y 50 µg/mL de Kanamicina, se incubó a 37°C con agitación durante 16 h, a partir de ese momento el cultivo fue inducido con 0.4 mM de IPTG. Posteriormente, el cultivo se dejó crecer durante 10 horas post-inducción y se tomó una muestra de 1 mL cada dos horas y se trató como se indica la sección 4.1.8.

4.1.6. Lisis celular

Una vez concluida la fermentación, el cultivo celular se centrifugó a 6000 rpm durante 15 minutos a 4°C. La lisis celular se siguió de acuerdo a la metodología de Lamla & Erdmann, 2004 (Modificada). El sedimento bacteriano se resuspendió en 5 mL de Tampón de Lavado 1 (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0). La mezcla se sonicó durante 4 horas a 4°C. El lisado celular fue centrifugado a 6000 rpm, 4°C por 15 min, la fracción soluble fue colectada y conservada a -70°C hasta su purificación, siguiendo la metodología del apartado 4.1.7.

4.1.7. Purificación de la proteína recombinante

La fracción soluble obtenida en el apartado 4.1.6 se pasó a un proceso de ultrafiltración. Este protocolo se llevó a cabo utilizando el Kit "Amicon® Ultra- 0.5 Centrifugal Filter Devices (Ultracel® - 10 K). La membrana de 10 K se insertó en un microtubo de 2 mL, después se agregó 500 µL de la fracción soluble en la membrana. Se centrifugó a 13,400 rpm durante 10 min o hasta que quedarán 50 µL en la membrana. Para recuperar el permeado, se colocó la membrana de manera invertida en un tubo nuevo y se centrifugó a 3,000 rpm por 1 min y esta fracción fue tratada siguiendo el apartado 4.1.7.1.

4.1.7.1. Purificación utilizando la etiqueta 6xHis en la columna Ni-NTA (Quiagen, 2001)

100 µL del permeado obtenido en el apartado 4.1.6 se mezclaron con 300 µL de Tampón de equilibrio (20 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 7.4). La parte inferior de la columna se removió gentilmente y se colocó en un microtubo de 2 mL, después se centrifugó a

3,000 rpm durante 1 min para remover el Tampón de almacenamiento. La columna se equilibró con 400 μ L del Tampón de equilibrio y se centrifugó a 3,000 rpm por 1 min. La columna se tapó con un tapón en la parte inferior y la muestra previamente preparada se introdujo en la columna y se mezcló en un agitador-orbital durante 30 min. Posteriormente, se quitó el tapón, la columna se introdujo en un microtubo nuevo de 2 mL y se centrifugó a 3,000 rpm durante 1 min para recolectar la fracción que no fue adsorbida (FT). La columna se lavó con 400 μ L de Tampón de Lavado (20 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 25 mM Imidazol, pH 7.4) para remover uniones inespecíficas de las proteínas unidas a la resina. La columna se centrifugó a 3,000 rpm durante 1 min y se colectó la fracción en un microtubo (L1). La columna se lavó dos veces más y cada fracción se colectó en un microtubo (L2, L3). En seguida la proteína se eluyó con 200 μ L de Tampón del Elución (20 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7.4) y se colectó la fracción en un microtubo (E1). La columna se eluyó dos veces más y cada fracción se colecta en un microtubo (E2, E3). Las muestras se tomaron en cada etapa para monitorear la retención y elución de la proteína por SDS-PAGE (Sección 4.2.2).

4.1.8. Extracción de la proteína total de *E. coli*

Durante la cinética de crecimiento de *E. coli* se tomaron muestras para el análisis en SDS-PAGE, para esto se tomó 1 mL de muestra cada dos hora durante 10 horas y se colocaron en un microtubo estéril de 1.5 mL. Las células se centrifugaron a 13400 rpm por 6 min, posteriormente se retiró el sobrenadante. La pastilla fue resuspendida en Tampón de carga (7 mL de 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 (se utilizó 60.55 g de Trizma base en 400 mL de agua desionizada), 3.0 g de glicerol, 1 g de SDS, 0.6 mL de 2- β -mercaptoetanol y 1.2 mg de azul de bromofenol.), seguida de un calentamiento a 95°C por 10 min. Se tomaron 25 μ L para analizar en SDS-PAGE (Sección 4.2.2). El crecimiento de las cepas de *E. coli* fue medido por DO_{600} , la concentración de proteína en cada carril fue normalizada para cargar un volumen que representara la concentración de la muestra con una DO_{600} de 0.6.

4.2. Análisis de la expresión de la proteína recombinante

4.2.1. Determinación de la concentración de proteína

La determinación de la cantidad de proteína se realizó siguiendo el protocolo de ensayo estándar en micro placa (Quick Start™ Bradford Protein Assay, Bio-Rad). Se preparó una curva de proteína estándar con Albúmina Sérica Bovina (BSA) de 0-2000 μ g/mL en agua estéril MiliQ. Se colocaron 5 μ L de la muestra BSA de concentración conocida en diferentes pozos

(siguiendo la figura 4), para el blanco se agregó 5 μL de agua estéril MiliQ, y en cada pozo se adicionaron 250 μL del reactivo de Bradford. Las muestras se mezclaron por agitación durante 15 s, y se incubaron por 5 min a temperatura ambiente en oscuridad, después se midió absorbancia a 595 nm en un lector de placas. Se realizó una gráfica de absorbancia en función a la concentración de proteína (Curva estándar – ANEXO 1). Las muestras de concentración de proteína desconocida fueron analizadas colocando 5 μL en cada pozo, para cada muestra se adicionó 250 μL de Reactivo de Bradford, se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min en oscuridad y se leyó su absorbancia a 595 nm. Para determinar la concentración de proteína se comparó el valor de la absorbancia en la curva estándar que se obtuvo con BSA.

Tube #	Standard Volume (μl)	Source of Standard	Diluent Volume (μl)	Final [Protein] ($\mu\text{g/ml}$)
1	20	2 mg/ml stock	0	2,000
2	30	2 mg/ml stock	10	1,500
3	20	2 mg/ml stock	20	1,000
4	20	Tube 2	20	750
5	20	Tube 3	20	500
6	20	Tube 5	20	250
7	20	Tube 6	20	125
8 (blank)	–	–	20	0

Figura 4. Concentraciones de BSA de la curva estándar. La columna “final” indica la concentración final de cada uno de los pozos.

4.2.2. SDS-PAGE

Se prepararon los Tampónes Ax2, Bx2, solución de APS, Tampón de carga de proteínas y Tampón Laemmli 10X. Para el Tampón Ax2 se utilizaron 9.06 g de Tris (Trizma base, 0.75 M) y 0.20 g de SDS aforando a 100 mL con agua desionizada ajustando el pH a 8.8 con HCl 1 M; para el Tampón Bx2 se utilizaron 3.02 g de Tris (Trizma base, 0.25 M), 0.2 g de SDS aforando a 100 mL con agua desionizada ajustando el pH a 6.8 con HCl 1 M. El Tampón de carga de proteínas se preparó con 10 mL de agua desionizada estéril, 7 mL de 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 (se utilizó 60.55 g de Trizma base en 400 mL de agua desionizada), 3.0 g de glicerol, 1 g de SDS, 0.6 mL de 2- β -mercaptoetanol y 1.2 mg de azul de bromofenol. La solución de APS se preparó al momento de utilizarse empleando 100 mg de Persulfato de Amonio en 1 mL de agua desionizada estéril. El Tampón Laemmli 10X (se preparó con 30.3 g de Tris, 144 g de glicina y 10 g de SDS), se llevó a 1 L con agua desionizada. Se ensambló el dispositivo (BioRad, EUA) entre las placas de vidrio (1 mm) se vertió primero el gel separador (para dos geles se utilizó 2

mL de Tampón Ax2, 2.85 mL de agua destilada estéril, 5 mL de acrilamida al 30%, 0.1 mL de SDS 10%, 50 μ L de Persulfato de amonio 10% y 10 μ L de TEMED) hasta un nivel de 1 cm por debajo de la altura de los peines. Se agregó isopropanol para permitir la formación de una línea horizontal; una vez polimerizado el gel, se retiró el isopropanol con papel filtro. Después se agregó el gel concentrador (0.5 mL del Tampón Bx2, 0.75 de acrilamida a 30%, 3.75 mL de agua destilada estéril, 50 μ L de SDS al 10%, 25 μ L de Persulfato de amonio al 10% y 7 μ de TEMED). Se colocó el peine y dejó polimerizar. Los geles se instalaron en el dispositivo y se agregó el Tampón Leammli 1X, verificando que no existirán fugas. Los peines se retiraron y se colocaron de 20 mg a 30 mg de proteína de cada una de las muestras con 10 μ L de Tampón de carga, las muestras se calentaron a 95°C por 5 min y se cargaron en los pozos de los geles. Los geles de corrieron a 30 Volts durante 15 minutos, durante la etapa de concentración y a 90 Volts por dos horas durante la etapa de concentración. Al finalizar, uno los geles se transfirieron a recipientes con solución teñidora (0.5 g de Azul de Coomasie en 500 mL de solución desteñidora) cubriéndolo completamente y dejándolo teñir durante toda la noche. Posteriormente, el gel se pasó a solución desteñidora (400 mL de metanol, 100 mL de ácido acético y 500 mL de agua desionizada) durante un día. Una vez desteñido el gel se tomó fotografía con escáner. El otro gel, se trató siguiendo el apartado 4.2.3.

4.2.3. Transferencia de proteínas

La transferencia de proteínas se realizó colocando los filtros en Tampón de transferencia (5.82 g de Tris, 2.93 g de glicina y 0.745 g de SDS en 700 mL de agua desionizada, se agregó 200 mL de metanol y se ajustó el volumen a 1 L) durante un mínimo de 30 min. Se cortó la membrana de nitrocelulosa (Immun-Blot PVDF membrane for protein blotting) haciendo un esquema del gel y se colocó en un recipiente con 15 a 30 mL de metanol durante 15 min. Después, se colocó Tampón de transferencia en la membrana durante 30 min, con agitación. Uno de los geles que se corrieron en el apartado 4.2.2 se colocó en un recipiente con Tampón de transferencia durante 15 min en agitación. Posteriormente, en el equipo de trans-blot se colocó uno de los filtros (que estaba en Tampón de transferencia) después la membrana de nitrocelulosa, a la cual se realizó una marca para reconocer el frente del gel de electroforesis el cual se colocó encima de la membrana. Y después otro filtro que estaba en Tampón de transferencia. Se conectó la fuente de poder y se transfirió durante 1 h a 18 V. Pasado el tiempo se procedió al tratamiento para Western blot (apartado 4.2.4)

4.2.4. Western blot

La membrana de la transferencia de proteínas se colocó en un recipiente con Tampón de bloqueo (2.5 g de leche descremada en polvo disuelta en 50 mL PSB-Tween el cual se preparó 100 mL de PBS 10X y 1 mL de Tween y aforando a 1L) durante toda la noche. Después, se retiró el Tampón de bloqueo y se le hacen 5 lavados con PSBT 1X durante 10 min, cada lavado en agitación continua. Posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo (2 μ L de Anti-His-HRP en 15 mL de PBST-Tween) durante al menos 1 h. Al pasar el tiempo, se retiró el anticuerpo y se hacen 5 lavados con PSBT 1X durante 10 min, cada lavado en agitación continua. Después se colocó la solución de revelado (con el kit Western-Light-hing plus-ECL) y se colocó la membrana en el transiluminador para revelarse cuidando que no se formaran burbujas.

5. PRODUCCIÓN DEL NANOCUERPO EN *E. coli*

La producción de proteínas recombinantes se realiza preferentemente en el sistema de expresión procarionte *E. coli*. La estrategia de este trabajo consistió en la verificación de la proteína recombinante que contenía el nanocuerpo, evaluando la producción y su identificación por western blot.

5.1. Construcción de pET28b para la transformación de *E. coli*

Para producir el anticuerpo camélido en *E. coli*, se insertó el gen que codificaba una proteína recombinante que contenía el nanocuerpo quimérico, la proteína mCherry usada como marcador de la proteína pues emite fluorescencia en 610 nm y dos etiquetas de purificación, NanoTag₉ e 6xHis (Figura 3) sintetizado por IDTDNA bajo especificaciones del equipo de trabajo en el vector pET28b. El peso molecular total de la proteína recombinante es aproximadamente de 45 kDa, el Nanocuerpo y la primera NanoTag₉ tienen un peso aproximado de 15 kDa mientras que el resto (SRP, Linker, mCherry, Linker, HIS y NanoTag₉) tienen un peso de 30 kDa.

La construcción del vector pET28b se realizó introduciendo el gen que codificaba para toda la proteína recombinante (Figura 4) entre los sitios *Sall* y *NcoI* (Figura 5). Una vez teniendo el vector ligado con el gen de interés se transformó *E. coli* BL21 siguiendo la metodología 4.1.4.



Figura 5. Representación esquemática de la construcción usada en la transformación de *E. coli*. Nanocuerpo, codifica para el dominio V_HH (o nanocuerpo quimérico) contra el virus del Papiloma humano que reconoce la proteína L1; NanoTag₉, etiqueta de purificación de 9 aminoácidos; SRP, Sitio de Reconocimiento de la Proteasa Enteroqueínasa; Linker, secuencia para unir mCherry; mCherry, codifica para la proteína fluorescente; HIS, Etiqueta de 6 Histidinas para purificación (6xHis); BD, BI, Borde derecho e izquierdo en el plásmido pET28b para *E. coli* BL21(DE3)

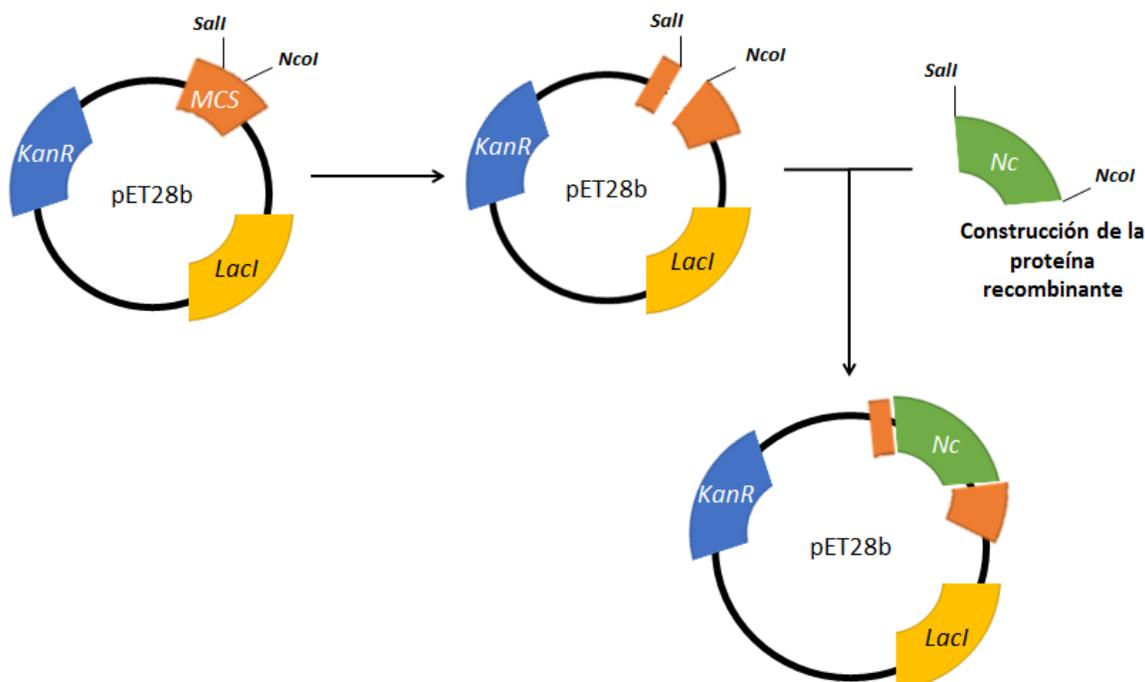


Figura 6. Representación esquemática de la construcción del vector de expresión pET28b usando la construcción (Nc) representada en la figura 4.

5.2. Expresión del nanocuerpo quimérico en *E. coli*

La producción de proteínas recombinantes se realiza preferentemente en el sistema de expresión procarionte *E. coli*. La fermentación se llevó a cabo en medio de cultivo LB (Sección 4.1.3) siguiendo la metodología de la sección 4.1.5.

Para monitorear la expresión de la proteína recombinante, se mantuvo un cultivo en lote durante 10 horas post-inducción y se tomó 1 mL de muestra en intervalos de 2 horas, la cual fue centrifugada para colectar la pastilla. La pastilla bacteriana fue tratada de acuerdo a la metodología descrita en la sección 4.1.8. En la figura 6 se muestran las muestras del cultivo de *E. coli* BL21(DE3) transformada con los vectores pET28b colectadas en intervalos de 2 horas y analizadas por SDS-PAGE (Sección 4.2.2), y se observa un incremento en la intensidad de la banda teñida con Coomassie después de las 6 horas de inducción cerca de los 45 kDa correspondiendo con el tamaño de la proteína recombinante construida.

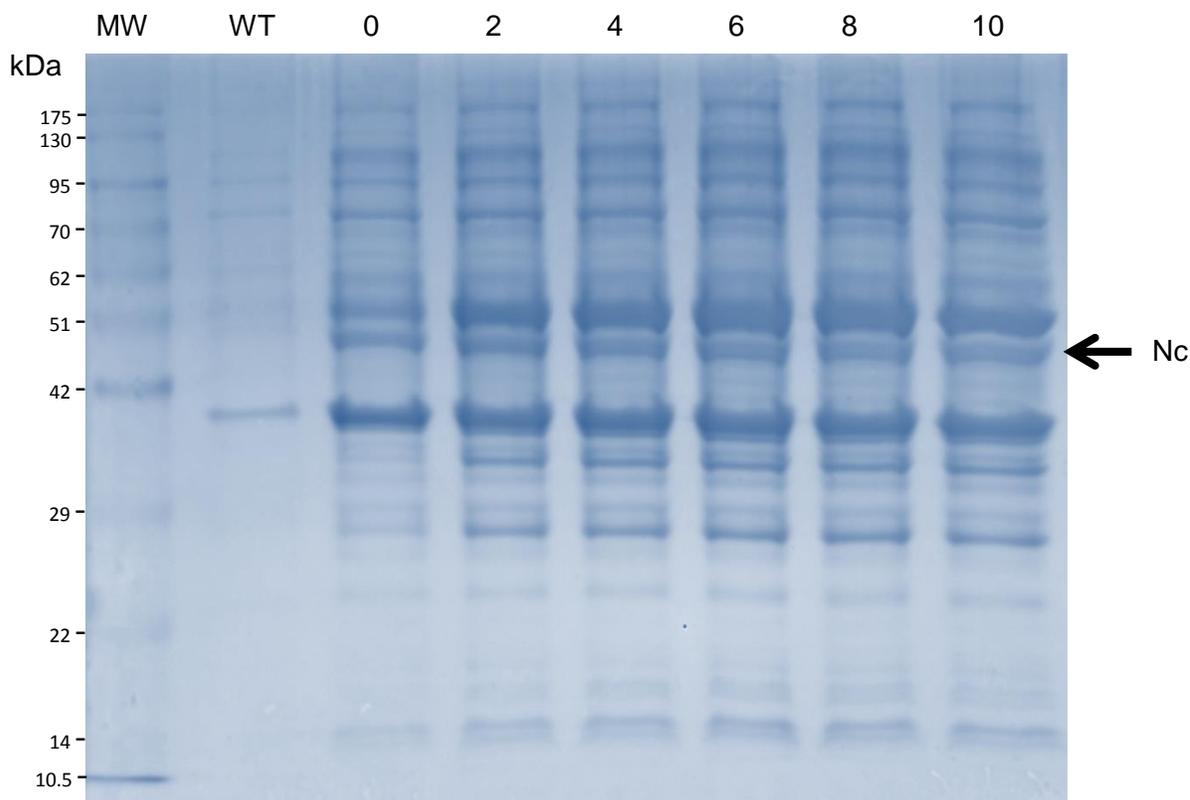


Figura 7. Expresión de la proteína recombinante en *E. coli* BL21(DE3). Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). MW) Marcador de peso Molecular. (WT) Proteína total de *E. coli* sin transformar al tiempo de 10 horas post-inducción; Carriles 0-10) Proteína total de *E. coli* BL21(DE3) trasformada con pET28b, tomada al tiempo 0, 2, 4, 6, 8 y 10 h después de inducir con IPTG.

Al término de la cinética el cultivo bacteriano de *E. coli* BL21(DE3) transformada se centrifugó y la pastilla bacteriana (Figura 7), que presentó el color de la proteína mCherry, se trató de acuerdo a la metodología descrita en la sección 4.1.6 para generar lisis celular, posteriormente se continuó con la purificación de la proteína recombinante que tenía al nanocuerpo quimérico (Sección 4.1.7).

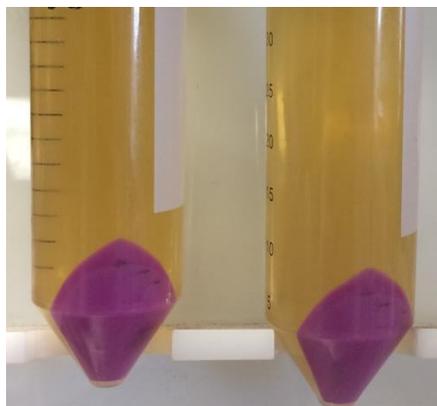


Figura 8. Pastilla bacteriana del cultivo de *E. coli* BL21(DE3), en un volumen de 250 mL, transformada con el vector pET28b después de 10 h en inducción con IPTG.

6. RECUPERACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL NANOCUERPO QUIMÉRICO

6.1. Purificación del nanocuerpo quimérico de *E. coli* por la etiqueta 6xHis.

La purificación de la proteína recombinante expresada en la fermentación de *E. coli* BL21 se empezó con un proceso de ultrafiltración con la membrana Ultracel® - 25 K (Sección 4.1.7) y después se pasó el permeado o concentrado a un proceso de cromatografía de afinidad (en una columna Ni-NTA), permitiendo la separación de proteínas que contenían la etiqueta de purificación 6xHis, para esto se siguió la metodología de la Sección 4.1.7.1 (Figura 8); las muestras de los lavados de la columna y los eluidos de la proteína recombinante fueron separadas en gel de acrilamida (Sección 4.2.2. SDS-PAGE), para monitorear el proceso de purificación (Figura 9).

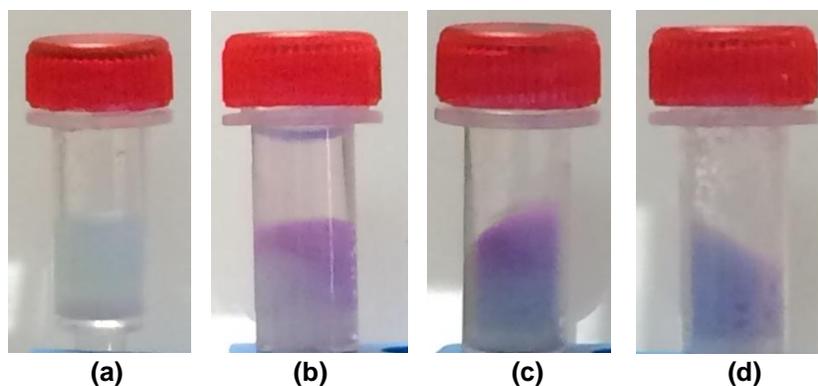


Figura 9. Cromatografía de afinidad con la columna Ni-NTA para purificar la proteína recombinante. (a) Columna Ni-NTA antes de iniciar la purificación; (b) Columna Ni-NTA después de 30 minutos de estar en contacto con la proteína recombinante; (c) Columna Ni-NTA después de realizar los 3 lavados con el Tampón de lavado; (d) Columna Ni-NTA después de realizar los 3 eluidos con el Tampón de elución. (Ver sección 4.1.7.1)

La proteína recombinante que contenía el nanocuerpo se purificó bajo condiciones nativas siguiendo la metodología 4.1.7.1, donde se obtuvo la fracción soluble de la proteína recombinante con el Tampón de elución. La figura 9 muestra el comportamiento que tuvo la purificación con la matriz de Ni-NTA; durante la etapa de lavado (Carriles W1, W2 y W3) de la columna con el Tampón de lavado, se observa que no fue removida la proteína recombinante. Sin embargo en la etapa de elución con el Tampón de elución, que contenía una concentración mucho mayor de Imidazol (E1, E2 y E3), fue posible identificar bandas entre 120 kDa y 20 kDa, principalmente en el primer eluido. La banda con mayor intensidad se encuentra muy cerca de los 50 kDa y 37 kDa correspondiendo al tamaño esperado de la proteína recombinante pues tiene un peso molecular de 45 kDa. Otras isoformas de la proteína recombinante purificada. Así mismo, otros estudios han demostrado que péptidos con histidinas no consecutivas son también capaces de quedar inmovilizadas en los iones metálicos y varias proteínas hospederas de *E. coli* también contienen residuos de histidina de forma no consecutiva (Robichon, et al., 2011) que se pudieron haber unido a la columna.

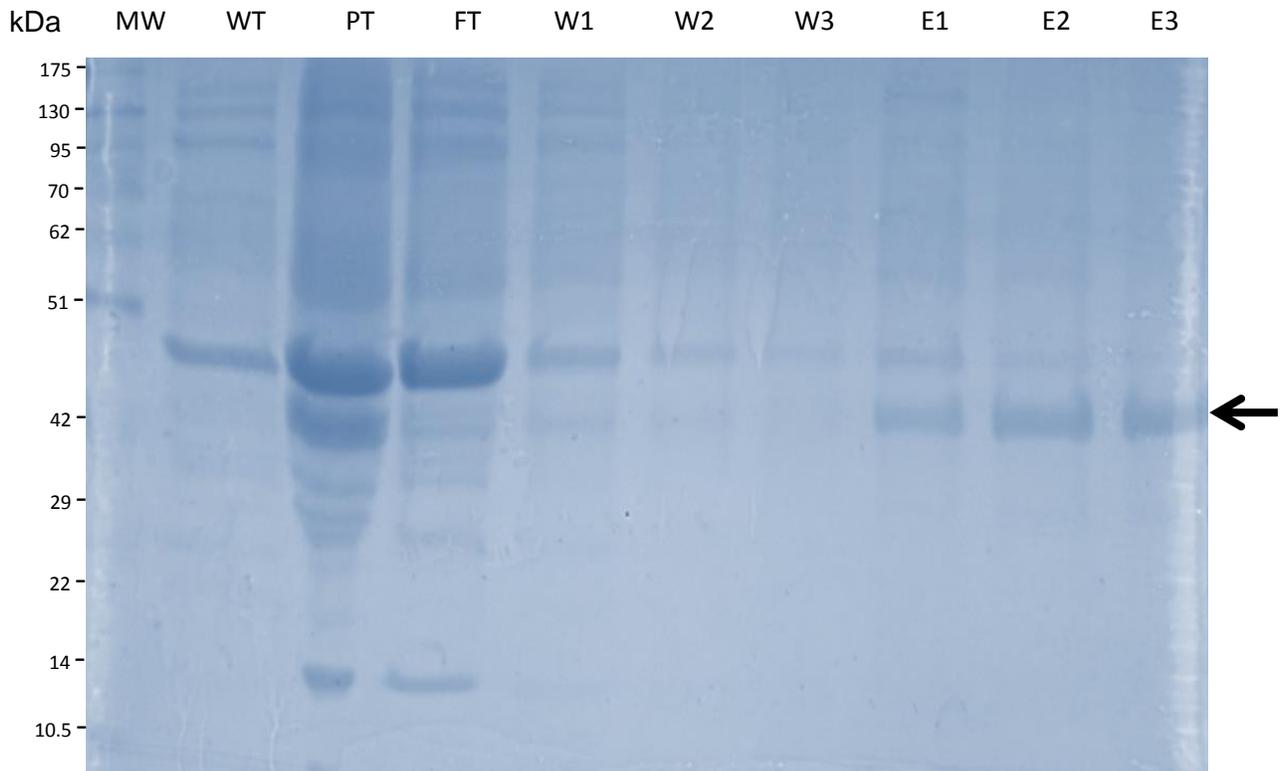


Figura 10. Purificación de la proteína recombinante que contiene el nanocuerpo quimérico en la columna Ni-NTA. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) con tinción azul de Comassie. (MW) Marcador de peso molecular; (WT) Proteína total de *E. coli* BL21(DE3) sin transformar al tiempo de 10 horas post-inducción; (PT) Proteína total de *E. coli* transformada al tiempo de 8 horas post-inducción; (FT) Filtrado; (W1) Primer lavado; (W2) Segundo lavado; (W3) Tercer lavado; (E1) Primera Elución; (E2) Segunda Elución; (E3) Tercera Elución.

La identificación de la proteína recombinante de *E. coli* BL21(DE3) se hizo por medio de western blot (Sección 4.2.4) utilizando el anticuerpo Anti-His-HRP, que reconoce a la etiqueta 6xHis, para lo cual las muestras fueron separadas por SDS-PAGE (Sección 4.2.2) o gel de poliacrilamida, el cual se observa en la figura 10. Posteriormente el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Sección 4.2.3) para finalizar con el Western blot (Sección 4.2.4). Los resultados del análisis por Western blot se muestran en la figura 11, donde se observan bandas de mayor intensidad entre 51 y 45 kDa en todos los carriles, a excepción de (WT), que corresponde al peso molecular de la proteína recombinante de aproximadamente 45 kDa, siendo en los primeros dos eluidos (E1 y E2) donde se observan dos únicas bandas (una por cada eluido) indicando la purificación de la proteína recombinante.

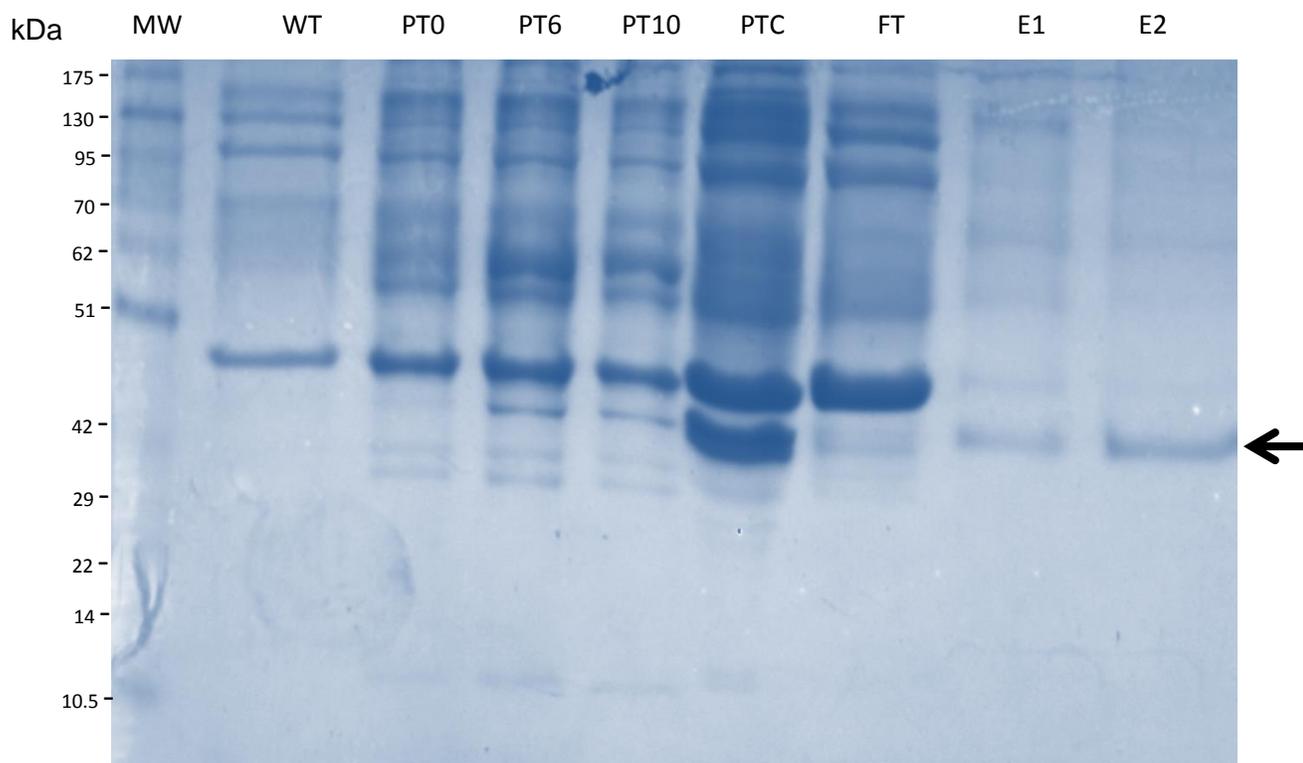


Figura 11. Purificación de la proteína recombinante que contiene el nanocuerpo quimérico en la columna Ni-NTA. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) con tinción azul de Comassie. (MW) Marcador de peso molecular; (WT) Proteína total de *E. coli* BL21(DE3) sin transformar; (PT0) Proteína total de *E. coli* BL21(DE3) transformada a inicio de la inducción con IPTG; (PT6) Proteína total de *E. coli* BL21(DE3) transformada a las 6 horas post-inducción; (PT10) Proteína total de *E. coli* BL21(DE3) transformada a las 10 horas post-inducción; (PT10) Proteína total de *E. coli* BL21(DE3) transformada (10 horas post-inducción) después de la ultrafiltración; (FT) Filtrado; (E1) Primera Elución; (E2) Segunda Elución.

Por otro lado, en el Filtrado (FT) o la fracción que no se unió a la columna Ni-NTA se logra ver una banda de menor intensidad tanto en el SDS-PAGE como en el Western blot entre 51 y 42 kDa indicando que no todas las proteínas recombinantes se unieron a la columna. Además se observa que las proteínas de *E. coli* BL21(DE3) no transformada no son reconocidas por el anticuerpo Anti-His-HRP.

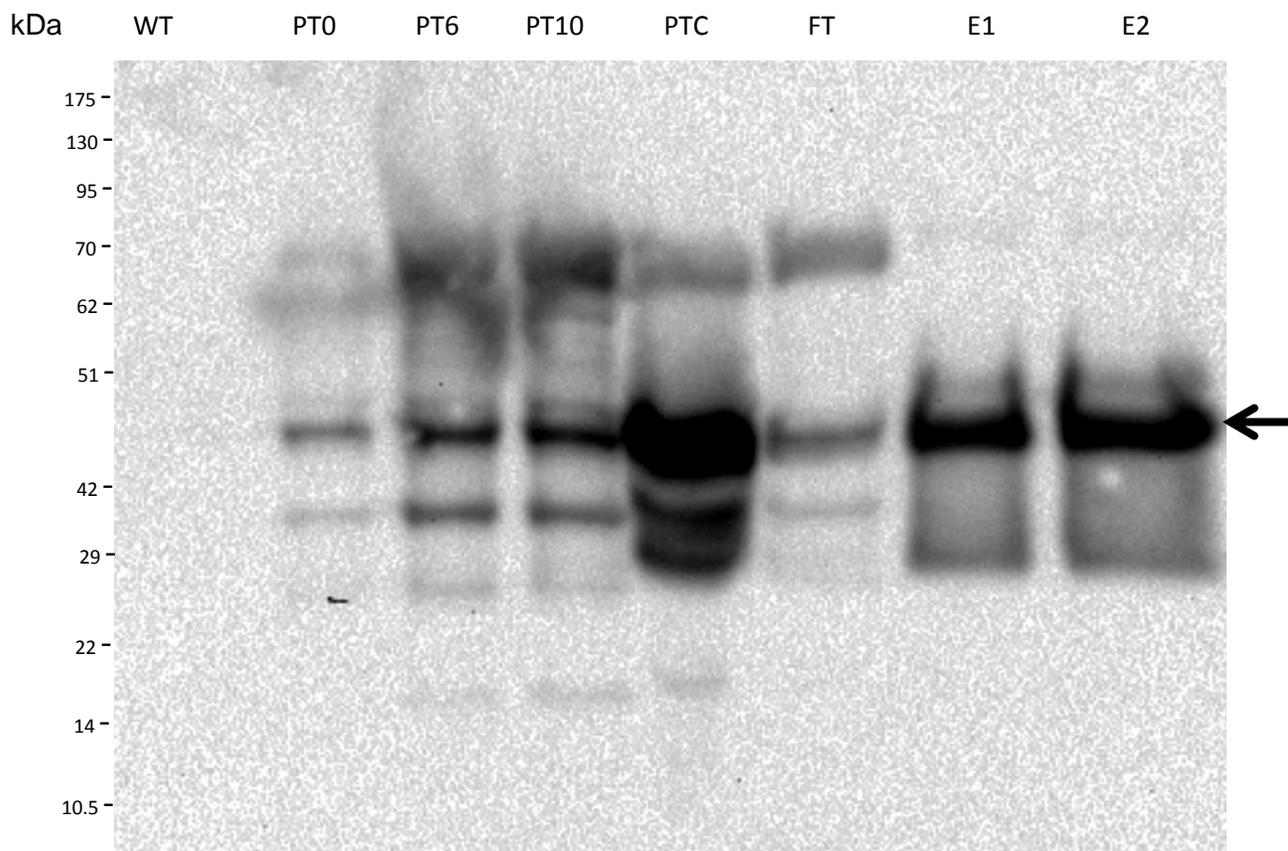


Figura 12. Western blot de la proteína recombinante que contiene el nanocuerpo. Las muestras fueron separadas por SDS-PAGE y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. (WT) Proteína total de *E. coli* BL21(DE3) sin transformar; (PT0) Proteína total de *E. coli* BL21(DE3) transformada a inicio de la inducción con IPTG; (PT6) Proteína total de *E. coli* BL21(DE3) transformada a las 6 horas post-inducción; (PT10) Proteína total de *E. coli* BL21(DE3) transformada a las 10 horas post-inducción; (PT10) Proteína total de *E. coli* BL21(DE3) transformada (10 horas post-inducción) después de la ultrafiltración; (FT) Filtrado; (E1) Primera Elución; (E2) Segunda Elución.

7. DISCUSIÓN

En este proyecto se verificó la construcción de un casete que contenía un nanocuerpo quimérico que reconoce a la proteína L1 del virus de papiloma humano (HPV). El nanocuerpo es quimérico debido a que sus regiones conservadas (o Frameworks) son de un nanocuerpo camélido y sus regiones variables pertenecen a un anticuerpo monoclonal producido en ratón que reconoce a la proteína L1 del HPV. El cassette se insertó en plásmido pET28b (Figura 5) y después fue transformado en *E. coli* BL21(DE3). Dicha construcción se llevó a cabo de manera exitosa, pues la expresión del gen se llevó a cabo en 10 horas en inducción con IPTG (Figura 6) y aunque autores establecen que la producción de proteínas recombinantes se logra entre 4 y 6 horas (Pardon, et al., 2014; Itoh & Sokol, 2014), en este proyecto se dejó inducir durante 10 horas después de 16 h de crecimiento, para asegurar la producción de la proteína recombinante.

Por otro lado el sistema del promotor T7 que está presente en el vector pET28b, controló la expresión de la proteína recombinante. En este sistema, la proteína recombinante fue clonada detrás de este promotor que es reconocido por la RNA polimerasa del bacteriófago T7. Esta polimerasa altamente activa está presente en el genoma de la bacteria *E. coli* BL21(DE3) y se encuentra bajo el control del promotor *lacUV5*. En ausencia del inductor IPTG, el gen *lacI* (presente en el plásmido pET28b y en el genoma de *E. coli* BL21(DE3)) expresa la proteína represora que se une al operador *lac* presente antes de los genes que codifican para la proteína recombinante y la RNA polimerasa T7 impidiendo su transcripción (Rosano & Ceccarelli, 2014). Sin embargo, se produce una pequeña cantidad de la proteína recombinante pues este sistema no se encuentra del todo apagado, por ello se puede apreciar una banda en los 45 kDa al tiempo de 0 horas de la inducción el SDS-PAGE (figura 7) y en el Western blot (Figura 11).

Al final del periodo de inducción, se logra observar que la biomasa adquiere el color de la proteína mCherry (Figura 7), en este caso, ya que mCherry estaba insertada en el casete, su función fue indicar que se estaba llevando a cabo la transcripción de todo el gen de manera correcta. Así mismo mCherry ayudó a monitorear la purificación en la columna Ni-NTA de manera cualitativa, pues en la Figura 8b se observa al extracto proteico en contacto con la resina y se aprecia que la proteína recombinante se adsorbe en la resina. Este mismo aspecto se sigue viendo en la Figura 8c, pues se sigue apreciando a la proteína recombinante adsorbida en la columna después de los tres lavados, indicando que ésta no se eluye en el proceso de

lavado. Por otra parte, en la figura 8d se observa que aunque se ve de un color rosa tenue, la proteína fue eluida pues no está del mismo aspecto que la figura 8b y 8c.

En este estudio la purificación se llevó a cabo bajo condiciones nativas. En las figura 9 y 10 se observan la elución de la proteína recombinante con la cola de 6xHis. En el análisis de electroforesis se observa que en los carriles donde se encuentran los eluidos es posible identificar una banda de mayor intensidad que corresponde a los 45 kDa que es el peso aproximado de la proteína recombinante. Las demás bandas pudieran ser proteínas de *E. coli* BL21(DE3) que tienen proteínas con Histidinas no consecutivas en el extremo carboxilo terminal, ya que existen estudios que estas proteínas también pueden formar enlaces covalentes con los iones metálicos inmovilizados (Robichon, et al., 2011).

En el Western blot también se logran bandas fuera de los 45 kDa, es decir proteínas que fueron reconocidas por el anticuerpo Anti-His-HRP que reconoce a la cola de 6xHis. Estas bandas, son proteínas o fragmentos inespecíficos que el anticuerpo identifico pues pudieran tener un fragmento igual o parecido a la cola de 6xHis. También, el vector pET28b tiene dos secciones que tienen la etiqueta 6xHis y al ser clonado el gen que codifica para la proteína recombinante en el vector existe una etiqueta 6xHis sobrante por lo que el anticuerpo Anti-His-HRP pudiera estar reconociendo ese fragmento de menor tamaño, pues en el Western blot (Figura 11) en los carriles de elución existen dos bandas la de 45 kDa que corresponde a la proteína recombinante y una de 29 kDa.

8. CONCLUSIONES

Se insertó el casete de expresión que contenía al nanocuerpo que reconoce la proteína L1 del HPV en el vector pET28b y se transformó en *E. coli* BL21(DE3).

Se expresó la proteína recombinante que contiene al nanocuerpo en 10 horas post-inducción con IPTG en *E. coli* BL21(DE3).

Se verificó la purificación de la proteína recombinante con la etiqueta His6x por SDS-PAGE y Western-blot.

9. PERSPECTIVAS

Estimar la eficiencia de recuperación de la proteína recombinante en la purificación

Determinar la afinidad del nanocuerpo quimérico producido en *E. coli* BL21 (DE3)

Clonar el casete de expresión que codifica para el nanocuerpo quimérico en los cloroplastos de *Chlamydomonas reinhardtii*.

10.REFERENCIAS

- Almaraz Delgado, A. L. y otros, 2014. Production of therapeutic proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *AMB Express*, 4(57), pp. 1-9.
- Barrera, D. J. y otros, 2015. Algal chloroplast produced camelid VHH antitoxins are capable of neutralizing botulinum neurotoxin. *Plan Biotechnology Journal*, Issue 13, pp. 117-124.
- Borowitzka, M. A., 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, Issue 70, pp. 313-321.
- Chen, X. S. y otros, 2000. Structure of Small Virus-like Particles Assembled from the L1 Protein of Human Papillomavirus 16. *Molecular Cell*, Volumen 5, pp. 557-567.
- Choi, B.-K.y otros, 2003. Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(9), pp. 5022-5027.
- Cortez-Retamozo, V. y otros, 2002. Efficient tumor targeting by single-domain antibody fragments of camels. *International Journal of Cancer*, Issue 98, pp. 456-462.
- Culp, T. D., Spatz, C. M., Reed, C. A. & Christensen, N. D., 2007. Binding and neutralization efficiencies of monoclonal antibodies, Fab fragmentes, and scFv specific for L1 epitopes on the capsid of infectious HPV particles. *Virology*, 2(361), pp. 435-446.
- De Genst, E. y otros, 2006. Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(12), pp. 4586-4591.
- Demain, A. L. & Vaishnav, P., 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, Issue 27, pp. 297-306.
- Dolk, E. y otros, 2005. Induced refolding of a temperature denatured llama heavy-chain antibody fragment by its antigen. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 59(3), pp. 555-564.
- Fischer, B., Sumner, I. & Goodenough, P., 1993. Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biotechnology and Bioengineering*, 41(1), pp. 3-13.
- Gellissen, G. y otros, 1992. High-level expression of foreign genes in *Hansenula polymorpha*. *Biotechnology Advances*, 10(2), pp. 179-189.

Hamers-Casterman, C. y otros, 1993. Naturally occurring antibodies devoid of light chains.. *Nature*, 363(6428), pp. 446-448.

Harmsen, M. M. & De Haard, H. J., 2007. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Applied Microbiology and Biotechnolog*, 77(13), pp. 21-30.

Harmsen, M. M., Van Solt, C. B., Fijten, H. P. D. & Van Setten, M. C., 2005. Prolonged in vivo residence times of llama single-domain antibody fragments in pigs by binding to porcine immunoglobulins. *Vaccine*, Issue 23, pp. 4926-4934.

Harris, E., 2001. Chlamydomonas as a model organism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, Issue 52, pp. 363-406.

Harrison, R. A. y otros, 2006. Neutralisation of venom-induced haemorrhage by IgG from camels and llamas immunised with viper venom and also by endogenous, non-IgG components in camelid sera. *Toxicon*, Issue 47, pp. 364-368.

Itoh, K. & Sokol, S. Y., 2014. Expression cloning of camelid nanobodies specific for Xenopus embryonic antigens. *PLoS One*, 9(10), pp. 1-7.

Kemp, T. J. y otros, 2011. HPV16/18 L1 VLP Vaccine Induces Cross-Neutralizing Antibodies that May Mediate Cross-Protection. *Vaccine*, 29(11), pp. 2011-2014.

Kimple, M. E., Brill, A. L. & Pasker, R. L., 2015. Overview of Affinity tags for Protein Purification. *Current Protocols in Protein Science*, 9(73), pp. 1-26.

Lamla, T. & Erdmann, V. A., 2004. The Nano-tag, a streptavidin-binding peptide for the purification and detection of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification*, Issue 33, pp. 39-47.

Lichty, J. J. y otros, 2005. Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expression and Purification*, Issue 41, pp. 98-105.

Mayfield, S. P., Franklin, S. E. & Lerner, R. A., 2003. Expression and assembly of a fully active antibody in algae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(2), pp. 438-442.

Modis, Y., Benes, L., T. & Harrison, S. C., 2002. Atomic model of the papillomavirus capsid. *The EMBO Journal*, 21(18), pp. 4454-4762.

- Motoyama, S., Ladines-Llave, C. A., Villanueva, S. L. & Maruo, T., 2004. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis.. *The Kobe journal of medical sciences*, 50(1), pp. 9-19.
- Muyldermans, S., 2001. Sigle domain camel antibodies: current status. *Reviews in Molecular Biotechnology*, Issue 74, pp. 277-302.
- Muyldermans, S., 2013. Nonobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annual Review of Biochemistry*, Volumen 82, pp. 775-797.
- Padlan, E. A., 1994. Anatomy of the antibody molecule. *Molecular Immunology*, 31(3), pp. 169-217.
- Pardon, E. y otros, 2014. A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. *Nature Protocols*, Issue 9, pp. 674-693.
- Parkin, D. M. y otros, 2008. Burden and Trends of Type-specific Human Papillomavirus Infections and Related Diseases in the Latin America and Caribbean Region. *Vaccine*, Issue 26S, pp. L1-L15.
- Robichon, C. y otros, 2011. Engineering Escherichia coli BL21(DE3) derivative strains to minimize E. coli protein contamination after purification by immobilized metal affinity chromatography.. *American Society for Microbiology*, 77(13), pp. 4634-4646.
- Rosano, G. L. & Ceccarelli, E. A., 2014. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5(172), pp. 1-17.
- Rosano, G. L. & Ceccarelli, E. A., 2014. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. *frontiers in Microbiology*, 5(172), pp. 1-17.
- Saarens, D., Hassanzadeh Ghassabeh, G. & Muyldermans, S., 2008. Sigle-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics. *Curren Opinion in Pharmacology*, 8(5), pp. 600-608.
- Schein, C. H., 1989. Production of soluble recombinant proteins in Bacteria. *Nature Biotechnology*, Issue 7, pp. 1141-1149.
- Schumann, W. & Ferreira, L. C. S., 2004. Production of recombinant proteins in Escherichia coli. *Genetics and Molecular Biology* , 3(24), pp. 442-243.

Swartz, J. R., 1996. *Escherichia coli* recombinant DNA technology. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology. *ASM Press*.

Terpe, K., 2003. Overview of tag protein fusion: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Issue 60, pp. 523-533.

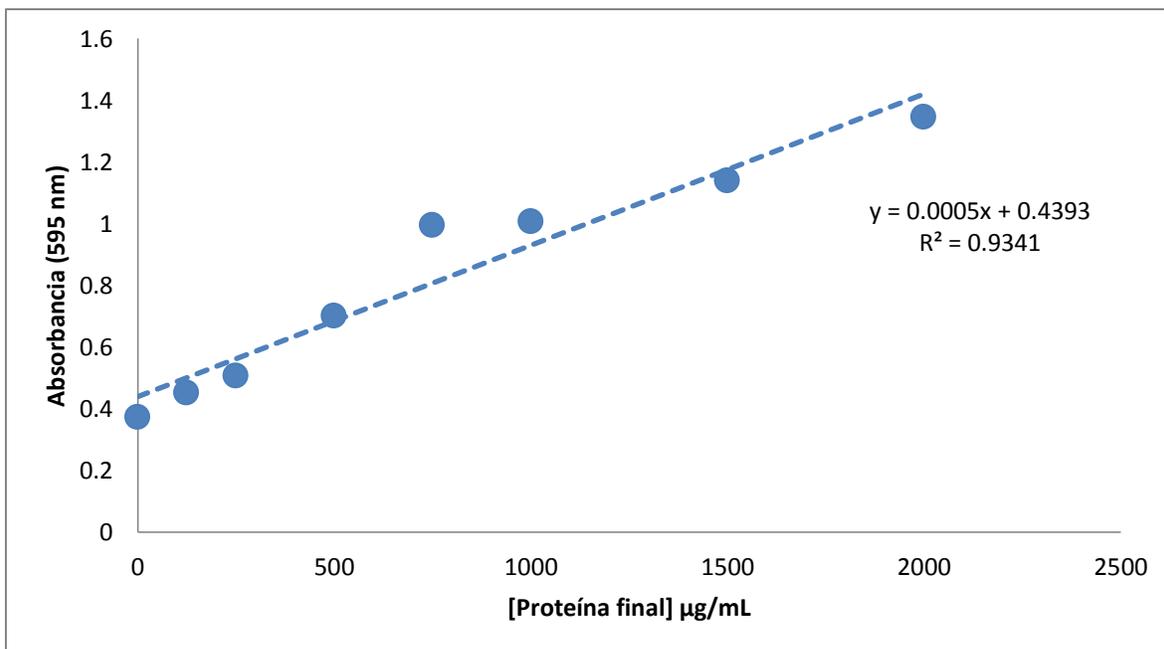
Tran Miller, y otros, 2013. Production of anti-cancer immunotoxins in algae: ribosome inactivating proteins as fusion partners. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(11), pp. 2826-2835.

Tran, M. y otros, 2009. Synthesis and Assembly of a Full-Length Human Monoclonal Antibody in Algal Chloroplast. *Biotechnology and Bioengineering*, 104(4), pp. 663-673.

Wang, Y. y otros, 2001. Human insulin from a precursor overexpressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and a simple procedure for purifying the expression product. *Biotechnology and Bioengineering*, 73(1), pp. 74-79.

Wesolowski, J. y otros, 2009. Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity.. *Medical Microbiologica Immunology*, Volumen 198, pp. 157-174.

11. ANEXOS



ANEXO 1. Curva tipo estándar para determinar la concentración de proteína con el método de Bradford, absorbancia (a 595 nm) en función a la concentración de proteína BSA (µg/mL).