

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



---

**Maestría en Ciencias  
Ciencias de la vida  
con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología**

---

**Evaluación de la capacidad neutralizante de TNF $\alpha$  por una  
proteína quimérica diseñada *in silico* a partir de un VNAR**

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

Presenta:

**Montserrat Rentería Maciel**

Ensenada, Baja California, México  
2021

Tesis defendida por  
**Montserrat Rentería Maciel**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro**

Director de tesis

Miembros del comité

**Dra. Nadia Lizeth Caram Salas**

**Dra. Anamaría Escofet**



---

**Dra. Patricia Juárez Camacho**

Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**

Directora de Estudios de Posgrado

*Montserrat Rentería Maciel © 2021*

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

Resumen de la tesis que presenta **Montserrat Rentería Maciel** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología

### **Evaluación de la capacidad neutralizante de TNF $\alpha$ por una proteína quimérica diseñada *in silico* a partir de un VNAR**

Resumen aprobado por:

---

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro  
**Director de tesis**

Los tratamientos anti-TNF $\alpha$  actuales presentan variados efectos secundarios y en algunos casos resultan ineficientes ya que se desarrolla tolerancia. En la búsqueda de tratamientos que no generen reacciones de inmunidad ni efectos secundarios, el equipo de trabajo en el que se inserta esta tesis ha desarrollado *in silico* una proteína quimérica (F\_T16) usando por primera vez a FN (dominio 15 del módulo III de la fibronectina humana) como andamio para el CDR3 de un VNAR anti-TNF $\alpha$ . Los dominios del módulo III de la fibronectina humana son del tamaño de una miniproteína, y a pesar de no tener enlaces disulfuro presentan una estructura terciaria similar a un VNAR. Durante el análisis *in silico* de interacción con TNF $\alpha$ , F\_T16 ha mostrado mayor reconocimiento que su VNAR parental, esto necesita comprobarse mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*. Esta tesis presenta ensayos *in vitro* para comprobar los resultados obtenidos *in silico*. Para esto se plantearon tres objetivos: 1. Obtener la proteína recombinante F\_T16. 2. Evaluar la capacidad de reconocimiento de la proteína quimérica por TNF $\alpha$ . 3. Comprobar la capacidad de la proteína quimérica para neutralizar TNF $\alpha$ . La obtención de los plásmidos recombinantes se logró mediante el robustecimiento del protocolo de ligación, las proteínas FN y F\_T16 se obtuvieron marcadas con la para su purificación e identificación. Para determinar la capacidad de reconocimiento: se realizó un ELISA utilizando un anticuerpo anti-HA, sin encontrar coincidencia con los resultados *in silico*; en consecuencia, se solicitó un ensayo *in silico* adicional con un modelo de F\_T16 que considerara las etiquetas HA y 6xHis; mostrando reconocimiento de TNF $\alpha$  por la etiqueta HA de F\_T16 y se corroboró mediante un ELISA utilizando un anticuerpo anti-6xHis. Sin embargo, la comprobación de la capacidad neutralizante no pudo completarse por restricciones de tiempo impuestas por la condición sanitaria actual. Futuros estudios deberán profundizar nuestros resultados para conocer si las regiones de TNF $\alpha$  a las que se une la etiqueta HA son las mismas a las que se une su receptor y, si lo anterior fuera positivo, corroborar la neutralización mediante un ensayo *in vivo* en células L929.

**Palabras clave:** Fibronectina humana, Humanización de anticuerpos, Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , Andamio, *Heterodontus francisci*

Abstract of the thesis presented by **Montserrat Rentería Maciel** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Biomedicine and Bionanotechnology.

### **Evaluation of the neutralizing capacity of TNF $\alpha$ by a chimeric protein designed *in silico* from a VNAR**

Abstract approved by:

---

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro  
**Thesis Director**

Current anti-TNF $\alpha$  treatments have various side effects and in some cases are inefficient as tolerance develops. In the search for treatments that do not generate immunity reactions or side effects, the team in which this thesis is inserted has developed *in silico* a chimeric protein (F\_T16) using for the first time FN (module III domain 15 of human fibronectin) as scaffolding for the CDR3 of an anti-TNF $\alpha$  VNAR. Module III domains of human fibronectin are the size of a mini-protein, and despite not having disulfide bonds they have a tertiary structure similar to a VNAR. During the *in silico* analysis of interaction with TNF $\alpha$ , F\_T16 has shown greater recognition than its parental VNAR, this needs to be verified by *in vitro* and *in vivo* assays. This thesis presents *in vitro* tests to check the results obtained *in silico*. Three objectives were set: 1. Obtain the recombinant protein F\_T16. 2. Evaluate the recognition capacity of the chimeric protein by TNF $\alpha$  3. Check the ability of the chimeric protein to neutralize TNF $\alpha$ . The recombinant plasmids were obtained by strengthening the ligation protocol, the FN and F\_T16 proteins were marked with the hemagglutinin labels (HA) and six histidines (6xHis) for purification and identification. To determine the recognition capacity: a ELISA was performed using an anti-HA antibody, without finding a match with the *in silico* results; consequently, an additional *in silico* assay with an F\_T16 model was requested that considered the HA and 6xHis labels; showing TNF $\alpha$  recognition by the HA label of F\_T16 and corroborated by an ELISA using an anti-6xHis antibody. However, the verification of neutralizing capacity could not be completed due to time constraints imposed by the current health condition. Future studies should deepen our results to know if the regions of TNF $\alpha$  to which the HA label is attached are the same to which its receptor is attached and, if this is positive, corroborate the neutralization by an *in vivo* assay in L929 cells.

**Keywords:** Human fibronectin, Antibody humanization, Tumor necrosis factor  $\alpha$ , Scaffolding, *Heterodontus francisci*

## Dedicatoria

A mi padre;  
quien con mano firme supo guiarme por el camino del estudio.

Este logro también es suyo.

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría con número de registro 913333 del programa de becas del posgrado.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por la oportunidad de incorporarme al Programa de Posgrado en Ciencias de la Vida y por todas las facilidades prestadas a lo largo de estos años.

A mi director de tesis, Dr. Alexei F. Licea Navarro por aceptarme como su estudiante y permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por su confianza al asignarme este proyecto, pero sobre todo, por apoyarme durante la realización de este trabajo. Gracias Doc!

Dra. Nadia Caram por aceptar ser parte de este proyecto, por su tiempo y críticas constructivas que ayudaron a enriquecer este trabajo.

Dra. Anamaría Escofet por formar parte de mi comité, por su dedicación y acertadas correcciones durante el desarrollo de este trabajo. Gracias también por preocuparse por mí salud y bienestar.

Dra. Karla Cervantes por compartir conmigo sus conocimientos, por la capacitación y enseñanza de diferentes técnicas durante el desarrollo de este proyecto, pero sobre todo, por su valiosa amistad.

M.C. Jahaziel Gasperin Bulbarela mi agradecimiento, respeto y admiración por siempre encontrar la manera de solucionar los diversos problemas técnicos que tuve a lo largo de la fase experimental.

M.C. Salvador Dueñas Espinoza por su valiosa asesoría y todo el apoyo de los ensayos *in silico*.

Dr. José Pedro Elizalde por escucharme y asesorarme durante el periodo de experimentación, por las buenas charlas discutiendo resultados y tomando un buen café.

A mis amigos y compañeros; QFB. Isaí Flores, Oc. Itzae Avendaño, Med. Sarah Amador por la capacitación, motivación y compañía durante los experimentos exitosos y fallidos. Pero sobre todo, por hacer más ameno este trayecto.

M.C. Samanta Jiménez y Dr. Ricardo González por su apoyo técnico durante el desarrollo de este proyecto.

Dr. Edgardo Sepúlveda por la amabilidad de prestarme su equipo de cómputo para poder terminar de escribir esta tesis.

Dra. Edna Sánchez Castrejón por el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

Al personal académico del programa de posgrado en Ciencias de la Vida, y a todos los que forman parte del Departamento de Innovación Biomédica, por todos los conocimientos compartidos.

A mi buen amigo Dr. Mario Humberto Guzmán y a su esposa Dra. Amanda Georgina Nieto por recibirme en su hogar durante mi primer cuatrimestre de posgrado.

A mis queridos amigos M.C. José Luis Duarte, M.C. Juan Ramos Pulido, Biol. Sadot Ramos, Biol. Víctor Aguilera, por enseñarme tantas cosas y ayudarme tantas veces durante esta aventura.

A mis queridas amigas, mi familia en Ensenada; Biol. Tonancy Rodríguez, Biol. Celeste Cervantes, Ing. Jimena (Mena) Rábago, Biol. Sarahí Martínez, Bioing. Mónica Rodríguez. Por rescatarme tantas veces, por desvelarse conmigo para terminar de estudiar, de escribir, de discutir o simplemente por hacer mejor mis días en CICESE y Ensenada.

A todos mis amigos y compañeros de generación LQMYLQVT, por toda la motivación, las risas y los abrazos!

A mi familia y amigos por su apoyo y muestras de cariño a pesar de la distancia.

A mi padre y hermana por siempre estar para mí, por su apoyo y constante motivación.

Y finalmente a ti Armando por todo tu amor y comprensión durante esta etapa, por alentarme para ampliar mi formación académica y por tu apoyo incondicional.

# Tabla de contenido

	Página
Resumen en español .....	i
Resumen en inglés .....	ii
Dedicatoria .....	iii
Agradecimientos .....	iv
Lista de figuras .....	ix
Lista de tablas.....	x
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1    Antecedentes .....	2
1.1.1    Factor de necrosis tumoral $\alpha$ (TNF $\alpha$ ) .....	2
1.1.2    Tratamientos anti- TNF- $\alpha$ .....	2
1.1.3    Inmunoglobulinas con Nuevo Receptor de Antígeno .....	3
1.1.4    Fibronectina como andamio .....	5
1.2    Justificación .....	6
1.3    Hipótesis.....	7
1.4    Objetivos .....	7
1.4.1    Objetivo general.....	7
1.4.2    Objetivos particulares .....	7
Capítulo 2. Metodología.....	8
2.1    Avances en el Equipo de Trabajo .....	9
2.1.1    Diseño <i>in silico</i> de una proteína quimérica anti-TNF $\alpha$ .....	9
2.1.1.1    Modelado <i>in silico</i> de la proteína quimérica F_T16 .....	9
2.1.1.2    Análisis de interacción proteína-proteína con TNF $\alpha$ .....	9
2.2    Construcción de Plásmidos Recombinantes .....	10
2.2.1    Diseño de los genes FN y F_T16 .....	10
2.2.2    Preparación de los Insertos FN y F_T16 .....	12
2.2.2.1    Amplificación de pUCIDT-AMP-F_T16 y pUCIDT-AMP-FN .....	13
2.2.2.2    PCR de colonia.....	13
2.2.2.3    Digestión de pUCIDT-AMP-F_T16 y pUCIDT-AMP-FN.....	14



2.2.3 Vector de expresión pET28a .....	15
2.2.3.1 Digestión de pET28a.....	16
2.2.4 Ligación.....	16
2.2.5 Confirmación de clonación.....	18
2.3 Expresión de Proteínas Recombinantes.....	19
2.3.1 Sistemas de Expresión .....	19
2.3.1.1 Purificación de Plásmidos recombinantes .....	19
2.3.1.2 Transformación de <i>E. coli</i> SHuffle .....	20
2.3.2 Expresión a pequeña escala .....	20
2.3.2.1 Extracción Periplásmica.....	21
2.3.2.2. Extracción Citoplásmica .....	21
2.3.2.3 Evaluación de la Expresión .....	22
2.4 Determinación del Reconocimiento por TNF $\alpha$ .....	22
2.4.1 Sistema de expresión para TN16.....	23
2.4.1.1 pComb3X .....	23
2.4.1.2 BL21-pComb3X-TN16 .....	24
2.4.2 Expresión a gran escala .....	25
2.4.2.1 Extracción por ultrasonificación.....	26
2.4.3 Purificación de proteínas recombinantes .....	27
2.4.3.1 Cromatografía por afinidad a metales inmovilizados .....	27
2.4.3.2 Cromatografía por inmunoafinidad .....	27
2.4.3.3 Diálisis.....	28
2.4.3.4 Evaluación de la purificación de proteínas .....	29
2.4.3.4.1 Tricina-SDS-PAGE .....	29
2.4.3.4.2 Inmunodetección .....	29
2.4.4 Ensayos de reconocimiento de TNF $\alpha$ .....	30
2.4.4.1 ELISA con anticuerpo anti-HA.....	30
2.4.4.2 Análisis <i>in silico</i> .....	31
2.4.4.3 ELISA con anticuerpo anti-6xHis.....	31
2.5 Determinación de la capacidad de neutralización .....	31
Capítulo 3. Resultados.....	33
3.1 Análisis <i>in silico</i> .....	33

3.2 Plásmidos recombinantes .....	38
3.2.1 Genes FN y F_T16 .....	38
3.2.2 Resultados de la amplificación de pUCIDT-AMP-FN y pUCIDT-AMP-F_T16 .....	38
3.2.3 Resultados de la digestión de pUCIDT-AMP-FN y pUCIDT-AMP-F_T16 .....	40
3.2.4 Resultados de la digestión del vector de expresión pET28a .....	41
3.2.5 Resultados de la ligación .....	43
3.2.6 Resultados de la secuenciación .....	45
3.3 Proteínas recombinantes .....	47
3.3.1 Sistema de expresión .....	47
3.3.2 Resultados de ELISA de expresión .....	48
3.4 Verificación de plásmido pComb3X-TN16 .....	50
3.5 Resultados de la purificación de proteínas .....	51
3.6 Evaluación del reconocimiento de TNF $\alpha$ por F_T16 .....	55
3.6.1 ELISA con anticuerpo anti-HA .....	55
3.6.2 Resultados de ensayo <i>in silico</i> .....	56
3.6.3 ELISA con anticuerpo anti-6xHis .....	58
3.7 Comprobación de la capacidad de la proteína quimérica para neutralizar a TNF $\alpha$ .....	59
Capítulo 4. Discusión .....	60
Capítulo 5. Conclusiones .....	63
Literatura citada .....	64

## Lista de figuras

	Página
<b>Figura 1.</b> Estructuras de anticuerpos .....	4
<b>Figura 2.</b> Esquema de la Fibronectina Humana .....	5
<b>Figura 3.</b> Comparación entre FN y un VNAR .....	6
<b>Figura 4.</b> Vector de clonación pUCIDT-AMP .....	12
<b>Figura 5.</b> Vector de expresión pET28a .....	15
<b>Figura 6.</b> Vector pComb3x.....	24
<b>Figura 7.</b> Modelos <i>in silico</i> F_t16 y TN16.. .....	34
<b>Figura 8.</b> Interacción proteína-proteína TNF $\alpha$ / F_T16 .....	35
<b>Figura 9.</b> Interacción proteína-proteína TNF $\alpha$ / TN16 .....	36
<b>Figura 10.</b> Interacción proteína-proteína TNF $\alpha$ / TNRF2 .....	37
<b>Figura 11.</b> PCR de colonias DH5 $\alpha$ pUCIDT-AMP-FN y pUCIDT-AMP-F_T16 .....	39
<b>Figura 12.</b> Lisis alcalina de pUCIDT-AMP-FN y pUCIDT-AMP-F_T16 .....	39
<b>Figura 13.</b> pUCIDT-AMP-FN y pUCIDT-AMP-F_T16 digeridos .....	41
<b>Figura 14.</b> Insertos purificados FN y F_T16 .....	41
<b>Figura 15.</b> Evaluación del vector de expresión digerido. ....	42
<b>Figura 16.</b> Evaluación del vector de expresión digerido y purificado .....	43
<b>Figura 17.</b> PCR pET28a-F_T16.....	44
<b>Figura 18.</b> PCR cultivo líquido pET28a-FN. ....	45
<b>Figura 19.</b> PCR de colonia pET28a-FN .....	45
<b>Figura 20.</b> Análisis de secuencias traducidas pET28a-FN y pET28a-F_T16 .....	46
<b>Figura 21.</b> Plásmidos recombinantes purificados por lisis alcalina .....	47
<b>Figura 22.</b> PCR de colonias SHuffle-pET28a-FN.....	48
<b>Figura 23.</b> PCR de colonias SHuffle-pET28a-F_T16 .....	48
<b>Figura 24.</b> ELISA de expresión de F_T16 .....	49
<b>Figura 25.</b> ELISA de expresión de FN.....	49
<b>Figura 26.</b> PCR de colonia pComb3x-TN16.....	50
<b>Figura 27.</b> Análisis de secuencia pComb3x-TN16.....	51
<b>Figura 28.</b> Evaluación de la purificación por IMAC de TN16 .....	52
<b>Figura 29.</b> Evaluación de la purificación de TN16 por inmunoafinidad con previa IMAC.....	53
<b>Figura 30.</b> Evaluación de la purificación por inmunoafinidad sin previa IMAC de TN16.....	53
<b>Figura 31.</b> Evaluación de la purificación de F_T16.....	54
<b>Figura 32.</b> Evaluación de la purificación de FN .....	54
<b>Figura 33.</b> ELISA de reconocimiento con anticuerpo anti-HA. ....	55
<b>Figura 34.</b> Interacción proteína-proteína TNF $\alpha$ /F_T16_HA. ....	57
<b>Figura 35.</b> ELISA de reconocimiento con anticuerpo anti-6xHis .....	59

## Lista de tablas

	Página
<b>Tabla 1.</b> Condiciones de PCR de colonia .....	14
<b>Tabla 2.</b> Condiciones de incubación.....	17
<b>Tabla 3.</b> Resumen de metodología y resultados esperados .....	32
<b>Tabla 4.</b> Resultados espectrofotométricos de pUCIDT-AMP-FN y pUCIDT-AMP-F_T16.....	39
<b>Tabla 5.</b> Resultados espectrofotométricos de PCR de pUCIDT-AMP-F_T16 y pUCIDT-AMP-FN .....	40
<b>Tabla 6.</b> Resultados espectrofotométricos F_T16 y FN digeridos y purificados .....	40
<b>Tabla 7.</b> Resultados espectrofotométricos de pET28a. ....	42
<b>Tabla 8 .</b> Resultados espectrofotométricos de pET28a-FN y pET28a-F_T16. ....	47
<b>Tabla 9.</b> Resultados espectrofotométricos de pComb3x-TN16. ....	50
<b>Tabla 10.</b> Sitios de interacción con TNF $\alpha$ .....	58
<b>Tabla 11.</b> Resultados esperados vs resultados obtenidos. ....	60

## Capítulo 1. Introducción

---

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$  por sus siglas en inglés) es una citocina proinflamatoria, involucrada en el desarrollo de diversas enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis reumatoide, la psoriasis o la enfermedad de Crohn. Los tratamientos para esas enfermedades están dirigidos hacia la neutralización de TNF $\alpha$ , las principales estrategias han incluido el uso de anticuerpos monoclonales, receptores solubles y fragmentos de unión a antígeno (Fab) anti-TNF $\alpha$ , que evitan la unión de la citocina a su receptor. Con el uso prolongado de estas terapias, se presentan una serie de efectos adversos e incluso tolerancia al medicamento. Actualmente, existe la necesidad de encontrar un mejor tratamiento contra TNF $\alpha$  ( Bojalil *et al.*, 2013; Abbas *et al.*, 2018; Ubah *et al.*, 2019).

Las inmunoglobulinas con nuevo receptor de antígeno (IgNAR) son un subconjunto único de anticuerpos que se encuentran en los tiburones. Presentan un dominio variable (VNAR) que cuenta con segmentos llamados regiones determinantes de complementariedad (CDR) los cuales permiten su unión a una gran variedad de antígenos, el mayor contacto se lleva a cabo con el CDR3. Nuestro equipo de trabajo ha aislado varios VNAR anti-TNF $\alpha$  provenientes del tiburón *Heterodontus francisci*, TN16 es uno de ellos. Los VNAR tienen un sinnúmero de ventajas sobre los anticuerpos convencionales, como tamaño pequeño (12-15 kDa) alta solubilidad, estabilidad térmica y química. Actualmente, se busca humanizar los VNAR y mejorar su tiempo de vida media, es por eso que se propone utilizar un andamio de fibronectina humana para estabilizar el CDR3 ( Camacho-Villegas *et al.*, 2013; Abbas *et al.*, 2018; Matz and Dooley, 2019).

La fibronectina es una glucoproteína presente en altas concentraciones en el plasma humano y está formada por tres tipos de módulos, los dominios de módulo tipo III de la fibronectina presentan una estructura semejante a las de los dominios variables de una cadena pesada (VH) ( Ruoslahti, 1988; Potts and Campbell, 1996; Lucena *et al.*, 2006).

Se ha demostrado la utilidad como andamio del décimo dominio del módulo III de fibronectina (<sup>10</sup> Fn3), representativo de los dominios de ese módulo ( Potts and Campbell, 1996; Koide *et al.*, 1998; Bloom and Calabro, 2009; Lipovšek, 2011). El dominio 15 del tercer módulo de la fibronectina humana (en adelante FN) fue resuelto por resonancia magnética nuclear (RMN) en 2017 (PDB ID 5M0A) y hasta el momento no tiene ninguna aplicación. El objetivo de este trabajo fue clonar, expresar y evaluar la actividad *in vitro* de una proteína quimérica, previamente diseñada *in silico* usando a FN como andamio para el CDR3 de TN16.

## 1.1 Antecedentes

### 1.1.1 Factor de necrosis tumoral $\alpha$ (TNF $\alpha$ )

Es una citocina proinflamatoria secretada principalmente por macrófagos. Se puede encontrar en sangre minutos después de una lesión o en situaciones de estrés, es la primera citocina en aparecer, la IL-1 o la IL-6 aparecen después y dependen de la liberación previa de TNF $\alpha$  (Valencia, 2002).

Su función fisiológica principal es estimular la atracción de neutrófilos y monocitos hacia los focos de infección, y activar a estas células para que erradiquen a los microorganismos invasores. Los efectos de TNF $\alpha$  a nivel sistémico son: reducción de la presión arterial y choque endotóxico, debido a que inhibe la contracción del miocardio y el tono del músculo liso vascular; trombosis intravascular debido a la supresión de la trombosmodulina y expresión del factor tisular, la trombosis en los vasos sanguíneos tumorales produce la necrosis tumoral. La producción prolongada de TNF $\alpha$  provoca pérdida de células epiteliales y adipocitos (Abbas *et al.*, 2018).

Desempeña un papel crítico en enfermedades inflamatorias sistémicas como la artritis reumatoide (AR), espondilitis anquilosante y enfermedades inflamatorias intestinales (EII) como la enfermedad de Crohn (Mitoma *et al.*, 2018).

### 1.1.2 Tratamientos anti- TNF- $\alpha$

Las principales estrategias para bloquear a TNF $\alpha$  incluyen el uso de anticuerpos monoclonales anti-TNF $\alpha$ , receptores de TNF $\alpha$  solubles humanizados con proteína IgG y fragmentos de unión a antígeno (Fab) anti-TNF $\alpha$  (Márquez-Velasco *et al.*, 2006).

A pesar del éxito de estas terapias, se observan efectos secundarios relacionados con la reacción del sistema inmunológico del paciente frente a las moléculas inmunoterapéuticas, creando anticuerpos anti-medicamentos (ADAs por sus siglas en inglés) (Kalden and Schulze-Koops, 2017); también se presenta daño renal y hepático, susceptibilidad a infecciones oportunistas, etc. Muchos de estos efectos secundarios son causados por el tamaño de los anticuerpos y/o receptores solubles, y su inmunogenicidad

se relaciona con la naturaleza de su secuencia no humana y la presencia del fragmento cristalizante (Fc)(Ubah *et al.*, 2019).

Debido a estos efectos secundarios, los anticuerpos de dominio único (sdAbs) se proponen como una alternativa atractiva para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico. Por su tamaño pequeño y alta solubilidad presentan fácil penetración de tejido, además poseen capacidad para bloquear sitios activos de proteínas y una alta afinidad (Monaco *et al.*, 2015).

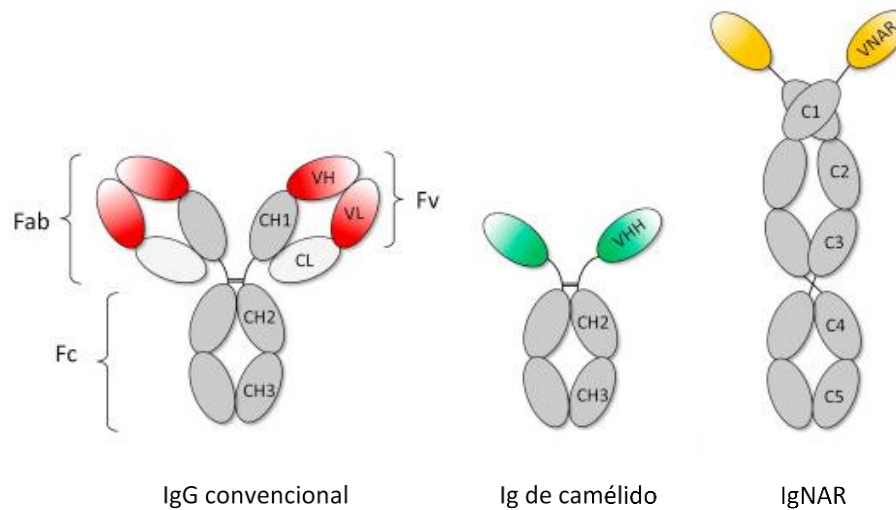
### **1.1.3 Inmunoglobulinas con Nuevo Receptor de Antígeno**

Los anticuerpos (inmunoglobulinas) son proteínas del sistema inmune de los vertebrados, pueden encontrarse en forma soluble (secretados) o anclados a membrana en la superficie de las células B en presencia de sustancias inmunógenas (Abbas *et al.*, 2018).

Los elasmobranchios, como los tiburones, cuentan con una inmunoglobulina (Ig) conocida como nuevo receptor de antígeno (NAR) que, a diferencia de las inmunoglobulinas convencionales, se componen solamente de dominios de cadena pesada, como se muestra en la figura 1 (Roux *et al.*, 1998).

En los dominios variables se presentan segmentos hipervariables de entre 10 y 35 aminoácidos, formando asas que sobresalen y conectan a las láminas  $\beta$ , también llamados regiones determinantes de complementariedad (CDR). De todas las regiones hipervariables, el CDR3 es el que presenta mayor variación en sus secuencias y es el que hace mayor contacto con el antígeno (Abbas *et al.*, 2018).

El reconocimiento de antígeno por las Ig convencionales se basa en la combinación de seis asas de CDR, proporcionados por los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas (VH y VL) en contraste, los dominios variables de IgNAR (VNAR) cuentan con un bucle CDR3 extendido, que puede acceder a los epítomos (regiones del antígeno reconocidas por el anticuerpo) típicamente no disponibles para las Ig convencionales (Matz & Dooley, 2019).



**Figura 1.** Estructuras de anticuerpos. Estructuras de dominio de IgG convencionales, Ig de cadena pesada de camélidos, NAR-TCR y IgNAR de tiburón. Los dominios variables (V) son de color, las regiones constantes de la cadena pesada (C) se muestran en gris, y las regiones de la cadena ligera (L) se muestran en blanco. Imagen modificada de Matz & Dooley (2019).

Una ventaja importante de los VNAR es el repertorio de distintas estructuras formadas por las regiones de unión, lo que ofrece la posibilidad de reconocimiento de epítomos que normalmente no son antigénicos para anticuerpos convencionales (Barelle and Porter, 2015). Otra ventaja es que son termoestables, en el 2013 Camacho-Villegas y colaboradores sometieron un VNAR a 95°C durante una hora y después de eso conservó el 85% de su actividad, mientras que los anticuerpos convencionales se desnaturalizan y pierden su actividad al exponerlos a 50°C durante 15 minutos, también, son estables a pH bajo y en presencia de proteasas. Además, los VNAR pueden ser obtenidos mediante la generación de bibliotecas sintéticas, evitando así el uso de animales vivos y su inmunización, permitiendo la generación relativamente fácil de anticuerpos recombinantes con especificidad por una gran variedad de antígenos, en un corto tiempo (Nelson and Sidhu, 2012; Matz and Dooley, 2019).

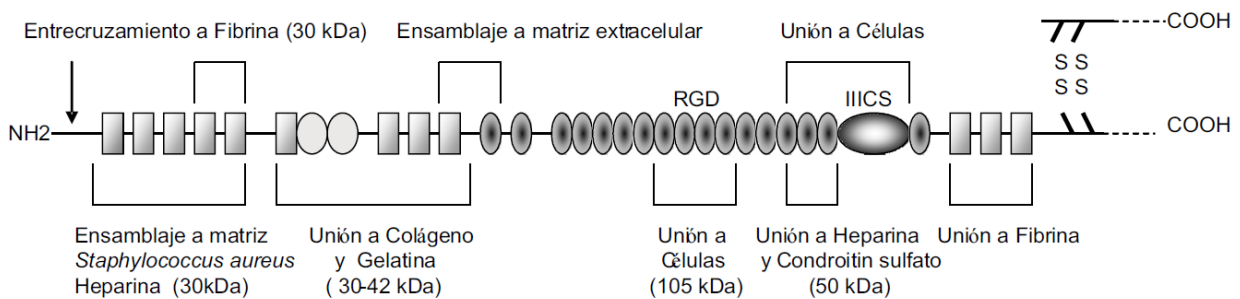
Su pequeño tamaño molecular permite una buena penetración y distribución del tejido, el tamaño de una Ig convencional (IgG) es de alrededor de 150 kDa mientras que el VNAR tiene un tamaño de entre 12 y 15 kDa. Además, son altamente solubles en soluciones acuosas, incluso en altas concentraciones. Estas propiedades facilitan diferentes vías de administración (oral, intravenosa, intraperitoneal, etc.) así como varios sitios de acción (Jank *et al.*, 2019).



### 1.1.4 Fibronectina como andamio

La fibronectina es una glucoproteína involucrada en la formación de matriz extracelular y en las interacciones célula-célula, es altamente conservada y sus niveles en plasma humano se consideran altos (300 µg/mL) (Ruoslahti, 1988; Main *et al.*, 1992).

Es una proteína mosaico, formada por varias repeticiones de tres tipos distintos de módulos proteicos (I, II y III) el módulo I cuenta con 12 dominios, dos el tipo II y 17 dominios el tipo III, ver figura 2 (Lucena *et al.*, 2006). Los dominios tipo III (FN3) median las interacciones proteína-proteína, ensamblaje de matriz y unión a heparina, presentan una región RGD que favorece la unión celular, no contienen enlaces disulfuro y su estructura  $\beta$ -sándwich es similar a una estructura de dominio de inmunoglobulina (Ruoslahti, 1988; Potts and Campbell, 1996).



**Figura 2.** Esquema de la Fibronectina Humana (Lucena *et al.*, 2006).

Todos los dominios FN3 están formados por aproximadamente 90 aminoácidos, el décimo dominio ( $^{10}\text{Fn3}$ ) que es representativo de este tipo de módulo, cuenta con 94 aminoácidos que se pliegan en siete cadenas  $\beta$  formando el  $\beta$ -sándwich. Los aminoácidos cercanos al extremo N-terminal forman tres bucles cuya estructura se asemeja a las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de los dominios variables de una cadena pesada (VH), en la figura 3 se observa la estructura  $\beta$ -sándwich del dominio 15 de la fibronectina en comparación con la estructura del VNAR TN43 (Main *et al.*, 1992; Potts and Campbell, 1996; Xu *et al.*, 2002; Lucena *et al.*, 2006).

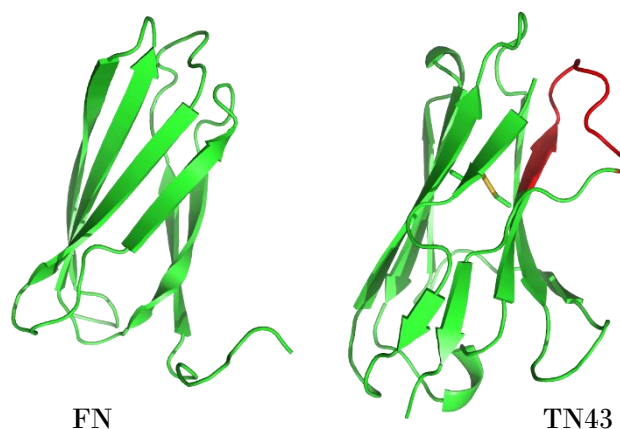
En 1998, Koide y colaboradores demostraron que el  $^{10}\text{Fn3}$  se puede utilizar como un andamio para el reconocimiento molecular. Debido a su termoestabilidad ( $T_m=90^\circ\text{C}$ ), solubilidad ( $>15\text{mg/mL}$ ) fácil

manipulación genética, compatibilidad con sistemas de expresión bacterianos y falta de enlaces disulfuro (Koide *et al.*, 1998; Bloom and Calabro, 2009).

En 2002, Xu y su equipo produjeron variantes de <sup>10</sup>Fn3 que se unían a TNF $\alpha$  con una constante de disociación ( $K_d$ ) de 1 a 24 nM (Xu *et al.*, 2002).

Lipovšek y su equipo desarrollaron una adefectina (familia de proteínas diseñadas basadas en <sup>10</sup>Fn3) recubierta en polietilenglicol (PEG) que presenta actividad anti-angiogénica uniéndose al receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y bloqueando su interacción con VEGF-A, VEGF-C y VEGF-D (Lipovšek, 2011).

El dominio 15 del módulo III de fibronectina (en adelante FN) cuenta con 86 aminoácidos, su estructura fue resuelta mediante resonancia magnética nuclear en 2017 (PDB ID 5M0A) y posee una mayor rigidez que <sup>10</sup>Fn3. Actualmente no existe ninguna patente con relación a FN.



**Figura 3.** Comparación entre FN y un VNAR. A la izquierda se observa FN (PDB ID 5M0A) a su derecha el VNAR TN43 con su CDR3 en color rojo. Fuente: Salvador Dueñas Espinoza usando ClusPro.

## 1.2 Justificación

Los tratamientos anti-TNF $\alpha$  actuales, basados en anticuerpos convencionales, presentan variados efectos secundarios y, en algunos casos, resultan ineficientes ya que se desarrolla tolerancia. El uso de VNAR's en terapias anti-TNF $\alpha$  es una opción viable debido a todas las ventajas que presentan sobre los anticuerpos monoclonales, tales como su tamaño pequeño, alta solubilidad y termoestabilidad. A pesar de estas

ventajas, los VNAR presentan una corta vida media y, por ser de otra especie, podrían resultar inmunogénicos. Debido a esto se busca rediseñar los VNAR conservando su capacidad de unión a antígeno.

En la línea de investigación que busca tratamientos que no generen reacciones de inmunidad ni efectos secundarios, el equipo de trabajo en el que se inserta esta tesis ha desarrollado *in silico* una proteína quimérica usando por primera vez a FN como andamio para el CDR3 de un VNAR anti-TNF $\alpha$ . Dicha proteína quimérica, que en el diseño *in silico* fue nombrada F\_T16, ha mostrado mayor reconocimiento por TNF $\alpha$  que su VNAR parental durante el análisis *in silico* de interacción proteína-proteína. Sin embargo, estos resultados necesitan ser comprobados mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Por lo anterior, se plantearon una serie de ensayos *in vitro* para poner a prueba la capacidad de F\_T16 en el reconocimiento de TNF $\alpha$ , girando en torno a la pregunta de investigación “La proteína quimérica, ¿conservará la capacidad para neutralizar TNF $\alpha$  que posee su parental?”

### **1.3 Hipótesis**

La proteína quimérica F\_T16 neutralizará a la citocina TNF $\alpha$ .

### **1.4 Objetivos**

#### **1.4.1 Objetivo general**

Aportar nuevas estrategias para tratar los padecimientos provocados por la presencia de TNF $\alpha$  en altas concentraciones.

#### **1.4.2 Objetivos particulares**

- Obtener la proteína recombinante F\_T16
- Determinar la capacidad de reconocimiento de la proteína quimérica por TNF $\alpha$ .
- Comprobar la capacidad de la proteína quimérica para neutralizar TNF $\alpha$ .

## Capítulo 2. Metodología

---

Para este trabajo se diseñó una ruta crítica, en la cual se consideraron los posibles sucesos que pudieran retrasar los experimentos y/o dar un giro al proyecto.

Para cumplir el primer objetivo, se procedió a diseñar los genes para expresar como proteínas recombinantes la quimera F\_T16 y el andamio FN, previamente diseñados *in silico*. Debido a que en el equipo de trabajo del Dr. Licea se utilizan las etiquetas 6xHis y HA, para purificar las proteínas mediante cromatografía de afinidad; se incluyó una etiqueta de hemaglutinina de la influenza humana (HA) en los genes y fueron clonados en el vector pET28a, que durante la expresión de las proteínas les añade una etiqueta de seis histidinas (6xHis) en el extremo carboxilo terminal. La clonación se realizó ajustando el protocolo de ligación de acuerdo a la indicación temprana de Sambrook y colaboradores (1989), que para la ligación de insertos con extremos cohesivos recomiendan la linearización previa del vector y el inserto. La expresión de las proteínas recombinantes se hizo en una cepa de *E. coli* diseñada para expresión citoplásmica de proteínas con enlaces disulfuro.

Para el segundo objetivo se expresaron las proteínas en gran escala y se purificaron. La purificación se llevó a cabo inicialmente por Cromatografía de Afinidad a Metales Inmovilizados (IMAC), y en un segundo paso por cromatografía de inmunoafinidad de la etiqueta HA. Para la evaluación de la purificación, se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE por sus siglas en inglés) y Western blot, usando un anticuerpo anti-HA para la inmunodetección. Los ensayos de reconocimiento de TNF $\alpha$  se llevaron a cabo en tres etapas: la primera, siguiendo el protocolo común del equipo de trabajo, consistió en un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés), utilizando un anticuerpo anti-HA para reconocer la etiqueta de hemaglutinina (HA). Debido a que el resultado obtenido de ese ensayo no coincidió con la predicción *in silico*, fue necesaria una segunda etapa que consistió en un análisis *in silico* adicional, teniendo como hipótesis que las etiquetas HA y 6xHis pudieran estar afectando la estructura de F\_T16, de manera tal que impidieran su interacción con TNF $\alpha$ ; se solicitó un nuevo modelo de F\_T16 que considerara las etiquetas HA y 6xHis, el nuevo modelo fue nombrado F\_T16\_HA y se utilizó en un análisis de interacción proteína-proteína con TNF $\alpha$ . Fue necesaria una tercera etapa para corroborar los resultados de este último ensayo *in silico*.

La comprobación de la capacidad de la proteína quimérica para neutralizar a TNF $\alpha$  no pudo completarse por restricciones de tiempo impuestas por la condición sanitaria imperante en las fechas.

## **2.1 Avances en el Equipo de Trabajo**

### **2.1.1 Diseño *in silico* de una proteína quimérica anti-TNF $\alpha$**

Los avances del equipo de trabajo en el que se inserta esta tesis incluyen el desarrollo *in silico* de una proteína quimérica con reconocimiento por TNF $\alpha$ . Para la construcción de la proteína quimérica se empleó el dominio 15 del módulo III de la fibronectina humana (FN), como andamio para el CDR3 de un VNAR con capacidad anti-TNF $\alpha$ , se evaluaron los CDR3 de los VNAR TN43, TN65 y TN16, el mejor resultado para el reconocimiento de TNF $\alpha$  se obtuvo con el CDR3 de TN16, por lo que la proteína quimérica fue nombrada F\_T16 y demostró, *in silico*, una capacidad de reconocimiento por TNF $\alpha$  mayor que su VNAR parental TN16.

#### **2.1.1.1 Modelado *in silico* de la proteína quimérica F\_T16**

El diseño del modelo de F\_T16, teniendo a FN como andamio para el CDR3 del VNAR TN16 (capaz de neutralizar a TNF $\alpha$ ), se realizó con modelado por homología utilizando MODELLER v.9.16 (Eswar *et al.*, 2007) a través de una estrategia conocida como “Modelado avanzado”, el modelo se refinó para su uso posterior en los análisis de interacción con TNF $\alpha$ . Para evaluar la calidad del modelo se obtuvieron los gráficos de Ramachandran usando la herramienta de servidor PROCHECK (Wang and Zhang, 2013). Una vez que se tuvo un modelo de buena calidad se realizó la dinámica molecular realizando simulaciones en una caja de agua como solvente, con las condiciones de un conjunto NPT - un número constante de partículas (N), condiciones isobáricas (P) e isotérmicas (T) constantes. La presión se ajustó a 1 atm y la temperatura a 300 °K, durante 50 ns.

#### **2.1.1.2 Análisis de interacción proteína-proteína con TNF $\alpha$**

El análisis de interacción proteína-proteína, también conocido como docking, fue efectuado con la herramienta web ClusPro (Comeau *et al.*, 2004) que se basa en complementariedades de superficies favorables, utilizando un protocolo de acoplamiento proteína-proteína. Para la visualización y selección de los mejores resultados se utilizó MacPyMOL: PyMOL v1.7.4.4 Edu Enhanced para Mac OS X. Para identificar

las regiones de interacción proteína-proteína predichas en ClusPro, se utilizó la herramienta Peptiderive en el servidor ROSIE usando la configuración predeterminada. Para el cálculo de acoplamiento, Peptiderive proporcionó una gráfica con los posibles residuos implicados en la interacción proteína-proteína, clasificada según la energía de la función de puntuación de Rosetta - Unidades de energía de Rosetta (REU) (London *et al.*, 2010; Lyskov *et al.*, 2013; Sedan *et al.*, 2016), que normalmente se asume que es un sustituto de la constante de afinidad derivada de  $\Delta G$ . En el análisis de interacción proteína-proteína de TNF- $\alpha$  con su receptor natural TNFR2, como control positivo, se utilizó solamente una cadena de TNFR2 para poder comparar los resultados con TN16 y F\_T16. Fue necesario obtener los modelos refinados de TNF $\alpha$ , TNFR2 y TN16 para poder evaluar los complejos TNF $\alpha$ / TNFR2, TNF $\alpha$ / TN16 y TNF $\alpha$ / F\_T16. El modelo tridimensional de TNF $\alpha$  se obtuvo a partir del refinamiento de su estructura resuelta por difracción de rayos X, obtenida de PDB (Protein Data Bank) con el ID 1TNF, TN16 se construyó por modelado por homología tal como se indica en el punto anterior, todos los modelos se refinaron de la misma manera que F\_T16.

## 2.2 Construcción de Plásmidos Recombinantes

Se diseñaron los genes para expresar a FN y F\_T16 en *E. coli*, y fueron sintetizados por el proveedor Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT).

Los genes sintéticos se clonaron en el vector de expresión pET28a, que agrega seis histidinas (etiqueta 6xHis) en el extremo carboxilo terminal de las proteínas, esta etiqueta es usada en la purificación por IMAC. Para corroborar la correcta clonación de los plásmidos recombinantes pET28a-FN y pET28a-F\_T16, fueron secuenciados los productos de PCR de colonias, las secuencias obtenidas se compararon contra las secuencias de los genes sintéticos FN y F\_T16.

### 2.2.1 Diseño de los genes FN y F\_T16

Con el objetivo de obtener de manera recombinante las proteínas F\_T16 y FN, se diseñaron sus genes para expresión en *E. coli*.

La secuencia de aminoácidos del andamio de la proteína, obtenida de PDB con el ID 5M0A, es la siguiente:

NASTGQEALSQT TISWAPFQDTSE YIISCHPVGTD EPLQFRVPGTST SATLTGLTRGAT YNIIVEALKDQQ  
RHKVREEVTVG NS

Los aminoácidos resaltados en color cian fueron reemplazados por el CDR3 de TN16 en la construcción de la proteína quimérica.

La secuencia de aminoácidos del CDR3 de TN16 es:

LIDTSVRGLAVP GNCERCSSYH

En el diseño de la proteína quimérica fue necesario reemplazar las 2 cisteínas del CDR3 (marcadas en rojo) por alaninas, para evitar la formación de puentes disulfuro que pudieran derivar en una estructura que impida la unión con el antígeno.

La secuencia diseñada *in silico* para la proteína quimérica F\_T16 fue la siguiente:

NASTGQEALSQTTILIDTSVRGLAVPGNAERASSYHYIISCHPVGTDDEEPLQFRVPGTSTSATLTGLTRGATYNIIVEALKD  
QQRHKVREEVTVGNS

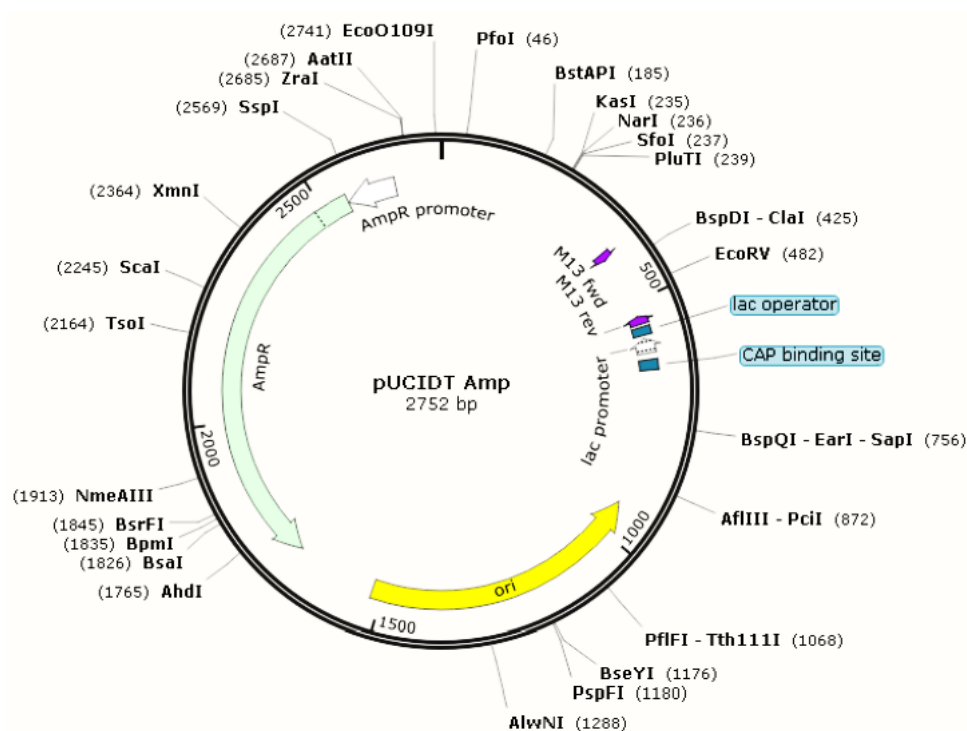
Los aminoácidos resaltados en color cian corresponden al CDR3 de TN16, de los cuales, las alaninas en color rojo sustituyen a las cisteínas del CDR3 original, el resto de los aminoácidos no resaltados pertenecen al andamio fibronectina.

Con el apoyo de M. C. Jahaziel Gasperin Bulbarena se diseñaron los genes para expresar las proteínas F\_T16 y FN en *E. coli*, usando el programa CLC Main Workbench 8.1.3 de QIAGEN; a cada gen se le agregaron dos sitios de restricción para poder hacer clonaciones usando enzimas de restricción, un sitio de restricción NcoI en el extremo amino terminal y un sitio de restricción XhoI en el extremo carboxilo terminal. Se agregó también, una etiqueta de hemaglutinina de la influenza humana (HA) para realizar la purificación e identificación de la proteína recombinante usando anticuerpos anti-HA, y finalmente se agregó un linker entre la secuencia de la proteína y la etiqueta HA. La adición de sitios de restricción, así como etiquetas para facilitar la purificación e identificación de las proteínas recombinantes, son accesorios utilizados comúnmente en el equipo de trabajo. En la literatura se menciona que más del 95% de las proteínas con

etiqueta HA han demostrado una excelente purificación sin afectaciones en su función biológica (Field *et al.*, 1988; Jarvik and Telmer, 1998; Brizzard, 2008; Li, 2010; Shen *et al.*, 2020). La síntesis de los genes fue solicitada al proveedor Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT).

## 2.2.2 Preparación de los Insertos FN y F\_T16

Los genes fueron insertados por el proveedor (IDT) en un vector de clonación pUCIDT de 2752 pb, con resistencia a ampicilina y un sitio de clonación múltiple, además posee un promotor y un terminador M13. Los genes se recibieron liofilizados, por lo tanto fueron resuspendidos en 200  $\mu$ L de buffer TE (Tris-HCl 10 mM/ EDTA 0.1mM, pH 8.5). Se realizaron alícuotas de 20  $\mu$ L a concentración de 20 ng/ $\mu$ L y se almacenaron a -80°C hasta su uso.



**Figura 4.** Vector de clonación pUCIDT-AMP



### 2.2.2.1 Amplificación de pUCIDT-AMP-F\_T16 y pUCIDT-AMP-FN

Para amplificar los plásmidos pUCIDT-AMP-F\_T16 y pUCIDT-AMP-FN, se transformaron células DH5 $\alpha$  quimiocompetentes, esta cepa de *E. coli* ofrece un alto rendimiento en la clonación de plásmidos. La transformación se realizó por choque térmico de la siguiente manera; dos alícuotas de 50  $\mu$ L de células y una alícuota de cada gen fueron colocadas en hielo durante 5 min, después se agregó 1  $\mu$ L de plásmido a cada alícuota y se dejaron incubar en hielo durante 30 min, luego se colocaron a 42°C durante 1 min e inmediatamente se regresaron al hielo, 2 min después se adicionaron 950  $\mu$ L de medio SOC (Peptona de Caseína 2 % / Extracto de Levadura 0.5 % / NaCl 0.05 % / KCl 2.5 mM / MgCl<sub>2</sub> 10 mM / Glucosa 20 mM) y se incubaron a 37 °C con agitación de 5 xg durante 1 hora. Se sembraron 50 y 100  $\mu$ L en placas con medio LB (Peptona de Caseína 1% / Extracto de Levadura 0.5% / NaCl 0.5%, pH 7.0) adicionado con carbenicilina a concentración final (C.F.) de 100  $\mu$ g/mL y se incubaron toda la noche a 37°C.

### 2.2.2.2 PCR de colonia

Para verificar que las colonias tuvieran el plásmido de interés, se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Fueron seleccionadas 5 colonias aisladas transformadas con pUCIDT-AMP-F\_T16 y 6 con pUCIDT-AMP-FN, utilizando los oligonucleótidos específicos para el promotor M13 (5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3') y para el terminador M13 (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'). Para cada colonia se preparó una PCR conformada por: solución tampón Green GoTaq Flexi (1X), MgCl<sub>2</sub> (3 mM), par de oligonucleótidos (0.4  $\mu$ M) y GoTaq DNA Flexi polimerasa (0.5 U), se utilizó agua libre de nucleasas (LN) para completar la reacción a un volumen final de 20  $\mu$ L, como templado se picó la colonia aislada con un asa estéril y se enjuagó en la reacción. Como control negativo de la amplificación se incluyó una reacción sin templado, como controles positivos se preparó una PCR con 0.5  $\mu$ L del plásmido pUCIDT-AMP-F\_T16 y otra con 0.5  $\mu$ L de plásmido pUCIDT-AMP-FN. Las condiciones de amplificación para cada ciclo térmico se describen en la tabla 1. Todos los productos de PCR (amplicones) fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Todos los geles de agarosa fueron teñidos con bromuro de etidio.

**Tabla 1.** Condiciones de PCR de colonia

Paso	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	2 min	1
Desnaturalización	95	30 s	30
Alineamiento	55	30 s	
Extensión	72	30 s	
Extensión final	72	5 min	1
Conservación	4	∞	

Se realizó un cultivo de 10 mL de medio SB (Peptona de Caseína 3.2% / Extracto de Levadura 2% / NaCl 0.5%, pH 7.0) con carbenicilina (C.F. 100 µg/mL) a partir de una colonia positiva para cada plásmido, se incubó durante toda la noche a 37 °C, al día siguiente se purificaron los plásmidos mediante lisis alcalina a baja escala (Sambrook and Russell, 2001) y se resuspendieron en 100 µL de agua LN. Los plásmidos purificados fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa al 1 %, fotodocumentados, cuantificados por espectrofotometría y conservados a -20 °C hasta su uso.

### 2.2.2.3 Digestión de pUCIDT-AMP-F\_T16 y pUCIDT-AMP-FN

Previo a la digestión se realizó una dilución 1:20 de los plásmidos purificados en el paso anterior (pUCIDT-AMP-FN y pUCIDT-AMP-F\_T16), para usarse como templado en reacciones de PCR. Se prepararon 4 reacciones de PCR de 75 µL para cada plásmido siguiendo el protocolo del punto anterior, utilizando como templado 1 µL de la dilución, para el control negativo se realizó una reacción sin templado. Los productos de PCR se purificaron mediante el kit 'QIAquick Gel extraction' (QIAGEN) siguiendo el protocolo que marca el proveedor, se purificaron 150 µL de reacción en cada columna y la elución de los productos de PCR (amplicones) se realizó con 30 µL de agua LN, se cuantificaron por espectrofotometría y se evaluaron antes y después de la purificación.

Los productos de PCR purificados (pUCIDT-AMP-FN y pUCIDT-AMP-F\_T16) fueron digeridos utilizando las enzimas de restricción XhoI y NcoI (Promega). Se prepararon 4 reacciones para cada uno, de la siguiente manera: solución tampón de enzima de restricción 1X, BSA acetilado (4 µg), NcoI (10 U), XhoI (10 U) y ~2 µg de material genético (pUCIDT-AMP-FN y pUCIDT-AMP-F\_T16), usando agua LN para llevar cada reacción

a un volumen final de 40  $\mu$ L. Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 4 horas, después, se inactivaron las enzimas durante 20 min a 80 °C.

Los productos de la digestión se purificaron con el kit 'QIAquick Gel extraction' (QIAGEN) recuperando cada fragmento en 32  $\mu$ L de agua LN. De ese material, 2  $\mu$ L se usaron para cuantificación y evaluación, los 20  $\mu$ L restantes fueron purificados por corte de banda; se cargaron en un pozo de doble ancho en un gel de agarosa 2%, se cortó la banda de interés (308 pb para FN y 344 pb para F\_T16) con la menor exposición posible a la luz UV, se colocó dentro de un tubo de 1.5 mL previamente pesado, y se purificó siguiendo el protocolo que marca el kit 'QIAquick Gel extraction' (QIAGEN), cada inserto se recuperó en 32  $\mu$ L de agua LN. Los insertos purificados fueron cuantificados por espectrofotometría, evaluados por electroforesis en gel de agarosa 2% y fotodocumentados. Se almacenaron a -20 °C hasta el momento de la ligación.

### 2.2.3 Vector de expresión pET28a

El vector comercial pET28a (+), de Novagen, tiene un tamaño de 5.4 Kb, presenta un promotor T7 inducible por IPTG, un origen de replicación pBR322, un gen de resistencia a kanamicina (KanR), un sitio de clonación múltiple y una secuencia específica para su purificación (etiqueta 6xHis). El vector de expresión usado en este trabajo cuenta con un VNAR insertado entre los sitios NcoI y BamHI, sin digerir tiene un tamaño de ~5.7 Kb y en adelante se menciona como pET28a (Figura 5).

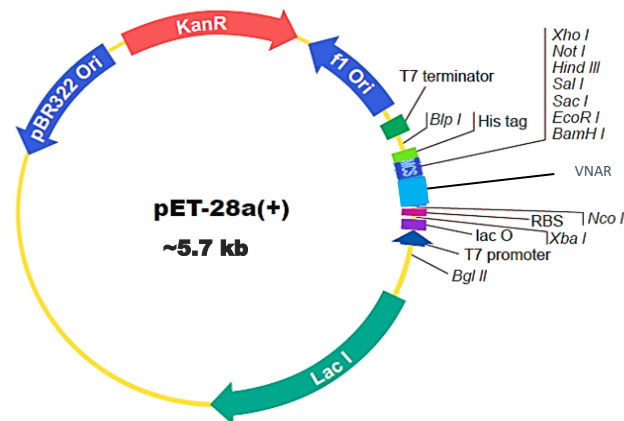


Figura 5. Vector de expresión pET28a

### 2.2.3.1 Digestión de pET28a

Para digerir 5 µg de pET28a, se prepararon 4 reacciones de 50 µL de reacción de digestión: solución tampón de enzima de restricción 1X, BSA acetilado (5 µg), NcoI (12.5 U), XhoI (12.5 U) y ~1.25 µg de Pet28a, usando agua LN para llevar al volumen final de 50 µL. Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 4 horas, y se inactivaron a 80 °C durante 20 min.

Se mezclaron los 200 µl digeridos para concentrarlos mediante una precipitación con isopropanol, agregando 0.1 volumen de acetato de sodio 3M y un volumen de isopropanol, se mezcló en vortex por 5 s y se incubó a -80 °C durante 1 hora, se centrifugó durante 15 min a 14000 rpm a 4 °C, se descartó el sobrenadante (SN) y se lavó el botón celular con 1 mL de etanol al 70%, después se centrifugó 5 min a 14000 rpm y 4 °C. Se descartó el SN y el tubo se dejó invertido durante 10 min para evaporar el etanol, enseguida se resuspendió en 22 µL de agua LN. Se usaron 2 µL para la cuantificación por espectrofotometría y la evaluación por electroforesis, en un gel de agarosa 0.7% teñido con bromuro de etidio, los 20 µL restantes se cargaron en otro carril del mismo gel para escindir la banda de interés y purificarla usando el kit 'QIAquick gel extraction' (QIAGEN), como control negativo se utilizó 1 µL (434 ng) de pET28a sin digerir.

Se escindió la banda correspondiente al vector digerido, con la menor exposición posible a la luz UV, y se colocó dentro de un tubo de 1.5 mL previamente pesado, se purificó siguiendo el protocolo que marca el proveedor. Para maximizar la extracción del vector digerido, se usaron 30 µL de agua LN a 50 °C, el vector digerido y purificado se cuantificó por espectrofotometría y se visualizó en gel de 1% agarosa teñido con bromuro de etidio, usando cómo control negativo 1 µL (434 ng) de vector sin digerir, fue fotodocumentado y almacenado a -20 °C hasta el momento de la ligación.

### 2.2.4 Ligación

Este paso se inició conforme a los estándares de procedimientos, pero debió ser ajustado de acuerdo a la indicación temprana de Sambrook y colaboradores (1989), recomendando que previo a la ligación de insertos con extremos cohesivos; deben mezclarse el agua, el vector y el inserto de la reacción, y mantenerse a 45°C durante 5 min con el objetivo de eliminar cualquier unión entre extremos cohesivos, que pudiera haberse generado después de la digestión.

La ligación de los insertos F\_T16 y FN con el vector de expresión pET28a, se inició empleando la enzima T4 DNA ligasa (Promega), la cual une las regiones complementarias de los sitios de corte de las enzimas de restricción. Los componentes de la reacción de ligación fueron: solución tampón de ligación (1X) (Promega), T4 DNA ligasa (1.5 U) (Promega), vector digerido (100 ng) e inserto en relación molar 1:5 (vector: inserto), 26.75 ng en la reacción para FN y 33.88 ng para la de F\_T16, llevando la reacción a un volumen final de 10  $\mu$ L con agua LN.

Para cada inserto se realizaron 5 reacciones con distintas condiciones de incubación (tabla 2), para las reacciones 4 y 5 se realizó un paso previo, que fue la recomendación antes mencionada (Sambrook *et al.*, 1989), quedando de la siguiente manera: en un tubo de 200  $\mu$ L se colocaron el vector, el inserto y el agua libre de nucleasas de la reacción, se calentaron durante 5 min a 45 °C y después se enfriaron a 4 °C, se adicionaron el resto de los componentes de la reacción y se procedió a la incubación. Para las ligaciones 4 y 5 se empleó la solución tampón 2X de rápida ligación (Promega), para el resto se utilizó la solución tampón de ligación 10X (Promega). Después del periodo de incubación se inactivó la enzima durante 10 min a 70 °C.

Para evaluar la digestión y purificación del vector, antes de la ligación de los insertos se realizó una prueba de autoligación, preparando una reacción de ligación como se indica en el párrafo anterior, pero sin inserto.

**Tabla 2.** Condiciones de incubación.

Reacción	1	2	3	4*	5*
Temperatura	4 °C	20 °C	37 °C	4 °C	15 °C
Tiempo	16 horas	16 horas	3 horas	15 horas	15 horas

\*Previa linearización y solución tampón de rápida ligación 2X.

El producto de la ligación fue utilizado para transformar células electrocompetentes de *E. coli* ER2738, mediante un electroporador MicroPulser (Bio-Rad Laboratories). Siguiendo el protocolo descrito por Barbas en 2001, se usaron 2  $\mu$ L de la reacción de ligación y 50  $\mu$ L de células electrocompetentes, se incubaron en hielo durante 5 min y se transfirieron a una celda para electroporar (2 mm) pre-enfriada. Para el control de transformación se usó 1  $\mu$ L de pET28a sin digerir, como control negativo se

transformaron células con pET28a digerido y purificado, pero sin inserto ni ligasa. Las condiciones de electroporación fueron 200  $\Omega$ , 2.5 kV por 4 ms.

Posteriormente, las células fueron recuperadas con 3 mL de medio SOC en un tubo cónico de 15 mL, se incubaron durante 1 hora con agitación constante de 5 xg a 37 °C, se sembraron 50 y 100  $\mu$ L en placas de medio LB + kanamicina (C.F. 30  $\mu$ g/mL) y se incubaron a 37°C durante toda la noche. El protocolo estándar indica solamente la siembra en placa, pero para poder asegurar que la ausencia de colonias en medio sólido fuera debido a la falta de clonación, se procedió de la siguiente manera: se agregaron 7 mL de medio SB y 60  $\mu$ g/mL de kanamicina a los ~2.85 mL restantes del cultivo, y se incubó durante toda la noche a 37 °C con agitación constante de 5 xg.

### 2.2.5 Confirmación de clonación

Para confirmar que la clonación se realizó correctamente, se realizó una PCR de los cultivos líquidos que presentaron crecimiento, utilizando los oligonucleótidos específicos para el promotor T7 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') y terminador T7 (5'-TAG TTA TTG CTC AGC GGT GG-3') usando como templado 1  $\mu$ L de cultivo, se preparó una reacción de PCR (20  $\mu$ L) para cada tubo, conformada de solución tampón Green GoTaq Flexi (1X), MgCl<sub>2</sub> (3 mM), par de oligonucleótidos (0.4  $\mu$ M) y GoTaq DNA Flexi polimerasa (0.5 U). De la misma manera, se preparó un control negativo de amplificación (reacción sin templado), y una PCR del cultivo de control de transformación (células transformadas con pET28a sin digerir), como control positivo. Las condiciones de amplificación para cada ciclo térmico se describen en la tabla 1. Los productos de PCR fueron evaluados por electroforesis en geles de agarosa al 2% y fotodocumentados.

Para obtener colonias aisladas, se estrió una asada del cultivo líquido sobre una placa de medio LB + kanamicina (C.F. 30  $\mu$ g/mL) y se incubó toda la noche a 37 °C. Las colonias aisladas se subcultivaron en otra placa medio LB + kanamicina (C.F. 30  $\mu$ g/mL), picando la colonia con un asa estéril para estriar sobre la placa, después el asa se enjuagó en 50  $\mu$ L de agua estéril para realizar PCR de colonias aisladas siguiendo el protocolo del párrafo anterior, sustituyendo 1  $\mu$ L de cultivo por 1  $\mu$ L de la colonia lavada.

Los productos de PCR de colonia del párrafo anterior, fueron evaluados por electroforesis en gel de agarosa 2% y fotodocumentados, los que presentaron el tamaño esperado se enviaron al laboratorio SeqXcel, Inc. (San Diego, CA, E.U.A), para su secuenciación empleando el oligonucleótido para el

terminador T7. Los resultados de la secuenciación fueron analizados con el programa CLC Main Workbench 8.1.3 (CLC bio, QIAGEN), comparándolos contra las secuencias de los genes sintéticos FN y F\_T16.

## **2.3 Expresión de Proteínas Recombinantes**

### **2.3.1 Sistemas de Expresión**

Una vez que se comprobó la correcta clonación, los plásmidos recombinantes pET28a-FN y pET28a-F\_T16 fueron purificados e introducidos en una cepa de expresión. La cepa SHuffle de *E. coli* ha sido diseñada para expresar proteínas que contienen enlaces disulfuro, producir proteínas correctamente plegadas y además, posee una buena tasa de rendimiento en su expresión citoplásmica; es por esto último que fue elegida para construir los sistemas de expresión SHuffle-pET28a-FN y SHuffle-pET28a-F\_T16.

#### **2.3.1.1 Purificación de Plásmidos recombinantes**

Una vez que se corroboró la correcta clonación de los insertos FN y F\_T16, se subcultivó la clona 7 de ER2738-pET28a-FN en 10 mL de medio LB + kanamicina (C.F. 30 µg/mL), incubando durante toda la noche a 37°C con agitación de 5 xg. Al día siguiente, con el objetivo de preservar las células ER2738-pET28a-FN se criopreservaron 4 mL del cultivo en glicerol al 20%; se colocaron 800 µL de cultivo + 200 µL de glicerol estéril en tubos de criopreservación, se rotularon y se almacenaron a -80°C, los 6 mL restantes se purificaron por lisis alcalina a baja escala (Sambrook and Russell, 2001) resuspendiendo en 42 µL de agua LN. El plásmido obtenido se cuantificó por espectrofotometría, se evaluó por electroforesis en gel de agarosa 0.7% y se fotodocumentó. Se utilizó 1 µL para transformar células y el resto se almacenó a -20°C. Se procedió de la misma manera con la clona 2 de pET28a-F\_T16.

### 2.3.1.2 Transformación de *E. coli* SHuffle

Se transformaron células *E. coli* SHuffle quimiocompetentes utilizando el plásmido purificado pET28a-FN, la transformación se llevó a cabo por choque térmico siguiendo el protocolo del punto 2.2.2.1. Se sembraron 50 y 100  $\mu$ L en placas con medio LB+ kanamicina (C.F. 30  $\mu$ g/mL) y se incubaron toda la noche a 37°C. Se llevó a cabo el mismo procedimiento para transformar células con el plásmido purificado pET28a-F\_T16 y para el control de transformación, utilizando 1  $\mu$ L del vector pET28a sin digerir.

Se realizó PCR de colonia para corroborar la introducción de los plásmidos en las células SHuffle, se tomaron 8 colonias aisladas de la transformación con pET28a-F\_T16 y 6 de la transformación con pET28a-FN, y se siguió el protocolo del punto 2.2.5 para llevar a cabo la PCR. Una vez que fue confirmada la presencia de los plásmidos recombinantes en las células SHuffle, con el objetivo de preservar las células; una de las clonas positivas de cada plásmido fue subcultivada en 5 mL de medio SB + kanamicina (C.F. 30  $\mu$ g/mL), incubando a 37°C con agitación constante de 5 xg, para su almacenamiento se colocaron 800  $\mu$ L de cultivo + 200  $\mu$ L de glicerol estéril en tubos de criopreservación, se rotularon y se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso.

### 2.3.2 Expresión a pequeña escala

Para poner a prueba los sistemas de expresión, se expresaron en pequeña escala las proteínas FN y F\_T16. A partir de las células SHuffle que contenían el plásmido pET28a-FN; se realizó una siembra en placa de agar LB + kanamicina (C.F. 30  $\mu$ g/mL), se incubó 12 horas a 37°C, y se utilizó una colonia aislada de la placa para preparar un pre-inóculo con 10 ml de medio SB + kanamicina (C.F. 30  $\mu$ g/mL), se incubó durante 12 horas a 37°C con agitación constante de 5 xg. Al día siguiente se colocaron 2 mL del pre-inóculo en un tubo cónico estéril de 50 mL, para realizar un cultivo de 10 mL de medio SB + kanamicina (C.F. 30  $\mu$ g/mL), se incubó a 37°C con agitación constante de 5 xg hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 ( $\pm$  0.05) a 600 nm, después se indujo la expresión con IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) a concentración final de 1 mM, se continuó la incubación en las mismas condiciones durante 6 horas más, al final de la inducción se cosecharon las células por centrifugación a 4000 xg durante 20 min a 4°C. Se obtuvo el peso final de los botones celulares húmedos y se almacenaron a -20°C. Se realizó el mismo protocolo para la expresión de F\_T16 usando las células SHuffle con pET28a-F\_T16.



### **2.3.2.1 Extracción Periplásmica**

Se descongelaron los botones celulares del punto anterior, y se realizó lisis por choque osmótico para la extracción de la proteína del periplasma de la bacteria, se agregaron 5 mL de solución tampón de Sacarosa 20% (Tris-HCl 30 mM / sacarosa 20% pH 8.0) + EDTA 1 mM + coctel inhibidor de proteasas 1X cOmplete™ (Roche) por cada 1 g de botón celular húmedo, se resuspendió el botón celular suavemente con pipeta, se incubaron los tubos en hielo sobre un oscilador con agitación moderada (44 rpm) durante 30 minutos. Se centrifugaron a 8000 xg durante 20 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante en tubos limpios de 50 mL y se almacenó a 4°C. Al tubo con el botón celular se le adicionaron 5 mL de MgSO<sub>4</sub> 5 mM+ coctel inhibidor de proteasas 1X cOmplete™ (Roche) por cada 1g de botón celular húmedo y se resuspendió usando vortex, se incubaron los tubos en hielo con agitación moderada durante 20 minutos, se centrifugaron nuevamente a 8000 xg durante 20 minutos a 4°C. Se colocó el sobrenadante en tubos limpios de 50 mL y se almacenó a 4°C, los botones celulares se usaron para la extracción citoplásmica. Se centrifugaron todos los sobrenadantes a 10000 xg a 4°C durante 30 min y se almacenó a 4°C una muestra de 1 ml para cada extracto, el resto se almacenó a -20°C. Se realizó el mismo protocolo para la extracción periplásmica de las proteínas FN y F\_T16.

### **2.3.2.2. Extracción Citoplásmica**

A los botones celulares del punto anterior, se les agregó 1 mL de la solución amortiguadora de sacarosa 25% (Tris-HCl 50 mM/ Sacarosa 25% pH 8.0) + EDTA 1mM + lisozima (100 µg/mL) coctel inhibidor de proteasas 1X cOmplete™ (Roche) por cada 0.1 g de botón celular, se incubó en hielo durante 30 min con agitación moderada (44 rpm) y después se congeló a -20°C. Al siguiente día se descongeló el botón celular colocándolo en termobañó a 37°C y se agregó un volumen de la misma solución amortiguadora antes mencionada, se centrifugó a 8000 xg durante 20 min a 4°C. Se colectó el sobrenadante en un tubo limpio de 50 mL y se centrifugó a 10000 xg durante 30 min a 4°C, se tomó una muestra de 1 ml para ser almacenada a 4°C, el resto se almacenó a -20°C. Se realizó el mismo protocolo para la extracción citoplásmica de FN y F\_T16.

### 2.3.2.3 Evaluación de la Expresión

Para evaluar la expresión de las proteínas FN y F\_T16, poniendo a prueba los sistemas SHuffle-pET28a-FN y SHuffle-pET28a-F\_T16, se realizó un ELISA de expresión. Este ensayo se llevó a cabo haciendo uso de la etiqueta HA que se agregó en el diseño de los genes de las proteínas. De cada sobrenadante crudo (obtenidos en las extracciones periplásmica y citoplásmica de las proteínas) se colocaron 50  $\mu$ L/pozo en una placa de ELISA de 96 pozos, la placa se incubó 1 hora a 37°C, se descartó la solución y se bloquearon los pozos con 200  $\mu$ L de BSA (albúmina de suero bovino) al 3% en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8 mM, pH 8.0) incubando 1 hora a 37°C. Se eliminó la solución de bloqueo y se agregaron 50  $\mu$ L de anticuerpo anti-HA-HRP High Affinity (Roche) diluido 1:5000 en BSA 1%-PBS 1X, se incubó 1 hora a 37°C. Cada pozo se lavó cinco veces con 200  $\mu$ L de PBST (PBS 1X-Tween 20 0.5%) después, se añadieron 50  $\mu$ L de sustrato para peroxidasa TMB-ELISA 1-Step™ Turbo (Thermo Scientific) y la placa se incubó durante 15 min a 37°C, se detuvo la reacción con ácido clorhídrico (HCl) 10%. Como blanco se empleó BSA 3%-PBS 1X y el ensayo se realizó por triplicado. La placa fue leída a 450 nm en un espectrofotómetro Epoch (BioTek).

Los valores de absorbancia obtenidos del lector EPOCH, tanto en éste ELISA de expresión como en los ELISA de reconocimiento, se analizaron con el programa Statistica 7.0 (Statsoft, 2010) mediante ANOVA de una vía con un intervalo de confianza del 95%, y en caso de una diferencia significativa menor a 0.05 se aplicó la prueba *post hoc* de Tukey, para identificar a los grupos con diferencia significativa.

## 2.4 Determinación del Reconocimiento por TNF $\alpha$

La determinación de la capacidad de reconocimiento de TNF $\alpha$  por la proteína quimérica se realizó en tres etapas, la primera consistió en un ELISA de reconocimiento utilizando un anticuerpo anti-HA, para reconocer la etiqueta de hemaglutinina de la influenza humana (HA) agregada en el diseño de los genes de FN y F\_T16, como control positivo se usó el VNAR parental (TN16) y como control negativo el andamio (FN) esta es la manera rutinaria del equipo de trabajo para evaluar el reconocimiento *in vitro*, y normalmente no son necesarias más etapas. El resultado de este primer experimento no fue el esperado ya que no coincidió con los ensayos *in silico*. Debido a esto, se revisó críticamente el modelo *in silico* de F\_T16 que, por haber trabajado bajo el supuesto de que las etiquetas HA y 6xHis no afectaban su reconocimiento por TNF $\alpha$ , no incluye las etiquetas. Planteando como hipótesis que las etiquetas pudieran

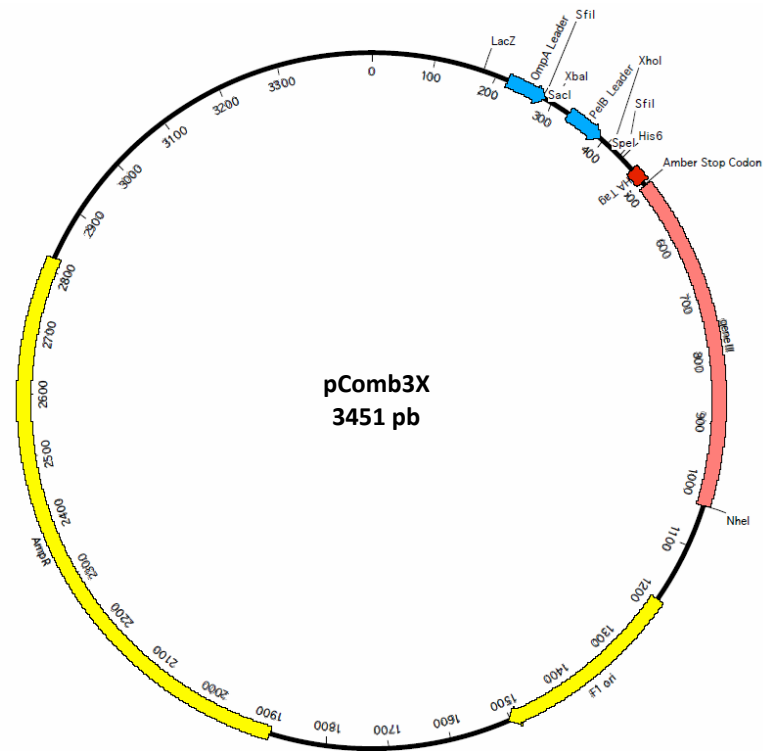
haber modificado la estructura de la quimera, de manera tal que se viera afectada su capacidad de reconocimiento por TNF $\alpha$ ; se dio paso a una segunda etapa al solicitar un ensayo adicional de interacción *in silico*, usando un nuevo modelo de F\_T16 que considerara a las etiquetas HA y 6xHis. Una tercera etapa fue necesaria para corroborar los resultados del nuevo ensayo *in silico*, mediante un ELISA empleando un anticuerpo con afinidad por la etiqueta 6xHis.

#### **2.4.1 Sistema de expresión para TN16**

El VNAR TN16 fue obtenido por la Dra. Tanya Camacho Villegas en 2013 a partir de una biblioteca no inmune de anticuerpos de tiburón *Heterodontus francisci*, posee capacidad neutralizante de TNF $\alpha$  y se encuentra insertado en el vector pComb3X. Se cuenta con un stock del plásmido pComb3X-TN16 liofilizado y criopreservado. TN16 fue expresado en la cepa BL21 y purificado para usarse como control positivo en los ensayos de reconocimiento por TNF $\alpha$ . La cepa BL21 de *E. coli* está modificada para la expresión de proteínas recombinantes en grandes cantidades.

##### **2.4.1.1 pComb3X**

Se trata de un vector fagémido que posee un promotor LacZ, un péptido señal pelB que dirige la síntesis de la proteína hacia el periplasma de la bacteria gram negativa, una etiqueta HA que facilita la inmunodetección, una etiqueta de seis histidinas útil para purificación, resistencia a ampicilina, un codón de paro y múltiples sitios de restricción (Barbas et al., 2001).



**Figura 6.** Vector pComb3x

#### 2.4.1.2 BL21-pComb3X-TN16

Para amplificar el material criopreservado, y posteriormente realizar la expresión de TN16, se transformaron células BL21(DE3) quimiocompetentes; resuspendiendo el plásmido en 20  $\mu\text{L}$  de agua LN y junto con una alícuota de 50  $\mu\text{L}$  de células quimiocompetentes, se incubó 15 min en hielo, posteriormente se colocaron 2  $\mu\text{L}$  de plásmido en las células, se dejaron incubar durante 30 min en el hielo, luego se sometieron a choque térmico durante 1 min a 42°C, se regresaron al hielo inmediatamente y 2 min después se agregaron 950  $\mu\text{L}$  de medio SOC al tubo, se incubó con agitación constante de 5 xg durante 1 hora a 37°C, se sembraron 50  $\mu\text{L}$  del cultivo sobre una placa de medio LB + carbenicilina, se incubó durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente se realizó PCR de 9 colonias aisladas, cada colonia se lavó en 50  $\mu\text{L}$  de agua estéril y, utilizando los oligonucleótidos ompseq (5'-AAG ACA GCT ATC GCG ATT GCAG-3') y gback (5'-GCC CCC TTA GCG TTT GCC ATC-3'), se preparó una reacción de 20  $\mu\text{L}$  para cada colonia aislada, con la siguiente composición: solución tampón Green GoTaq Flexi (1X),  $\text{MgCl}_2$  (3 mM), par de oligonucleótidos (0.4  $\mu\text{M}$ ) y GoTaq DNA Flexi polimerasa (0.5 U), como templado se utilizó 1  $\mu\text{L}$  de la colonia lavada, se llevó

a volumen con agua LN. Las condiciones de amplificación para cada ciclo térmico se describen en la tabla 1, los productos de PCR se evaluaron en gel de agarosa 2%.

Los productos de PCR positivos al fragmento de interés fueron enviados al laboratorio SeqXcel, Inc. (San Diego, CA, E.U.A) para su secuenciación empleando el oligonucleótido gback. Los resultados de la secuenciación fueron analizados con el programa CLC Main Work Bench 8.1.3 (CLC bio, QIAGEN), comparando contra la secuencia reportada del VNAR TN16. Una vez confirmada la secuencia de TN16, con el objetivo de preservar las células; una de las clonas positivas fue subcultivada en 5 mL de medio SB + carbenicilina (C.F. 100 µg/mL), incubando a 37°C con agitación constante de 5 xg, para su almacenamiento se colocaron 800 µL de cultivo + 200 µL de glicerol estéril en tubos de criopreservación, se rotularon y se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso.

#### **2.4.2 Expresión a gran escala**

Para llevar a cabo la producción del VNAR TN16 se utilizaron las células preservadas en glicerol del punto anterior, se realizó una siembra en placa de agar LB + carbenicilina (C.F. 100 µg/mL), después de una incubación de 12 horas a 37°C se preparó un pre-inóculo de 10 ml de medio SB + carbenicilina (C.F. 100 µg/mL) utilizando una colonia aislada de la placa, se incubó durante 12 horas a 37°C con agitación constante de 5 xg. Al día siguiente se usó el pre-inóculo para realizar 4 cultivos de 250 mL, se agregaron 250 mL de medio SB + carbenicilina (C.F. 100 µg/mL) y 2.5 mL de pre-inóculo en matraces estériles de 1000 mL, se incubaron a 37°C con agitación constante de 10 xg hasta alcanzar una densidad óptica de 0.65 ( $\pm$  0.1) a 600 nm, para inducir la expresión se agregó IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) a concentración final de 1mM, se continuó la incubación en las mismas condiciones durante 6 horas. Al finalizar la inducción se cosecharon las células, en 6 tubos cónicos estériles de polipropileno de 50 mL, centrifugando el cultivo a 4000 xg durante 20 minutos a 4°C. Se almacenaron a -20°C tanto los botones celulares como el medio sobrenadante. Se realizó el mismo protocolo para la expresión de FN y F\_T16 usando las células SHuffle con los plásmidos pET28a-FN y pET28a-F\_T16, sustituyendo el antibiótico carbenicilina por kanamicina (C.F. 30 µg/mL).

### 2.4.2.1 Extracción por ultrasonicación

Debido a los resultados observados en las extracciones de la expresión a pequeña escala, se optó por realizar la extracción de las proteínas expresadas a gran escala usando un protocolo distinto.

Los botones celulares de la expresión de TN16 se descongelaron y fueron resuspendidos en NPI 20 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM/ NaCl 300 mM/ Imidazol 20 mM) + lisozima (200 µg/mL) + coctel inhibidor de proteasas 1X cComplete™ (Roche). Las células fueron lisadas por acción mecánica del ultrasonicador QSONICA en 10 ciclos de 30 s On / 15 s Off con una amplitud del 70%, las muestras permanecieron en hielo durante todo el proceso. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 8000 xg durante 20 min a 4°C, el sobrenadante se recolectó en tubos limpios de 50 mL y fue centrifugado nuevamente en las mismas condiciones 2 veces más, cada vez se recuperó el sobrenadante en un tubo limpio para eliminar el detrito celular, se almacenó a 4°C para su inmediata purificación mediante Cromatografía de Afinidad a Metales Inmovilizados (IMAC) y, posteriormente por cromatografía de inmunoafinidad anti-HA.

Debido a los resultados de la purificación de TN16 y con la intención de variar las condiciones en el protocolo de la purificación por IMAC, se realizó una nueva expresión del VNAR tal como lo indica el punto anterior, y siguiendo el protocolo del párrafo anterior se realizó la extracción. El retraso en el proyecto debido a la pandemia por COVID19 nos orilló a purificar directamente por cromatografía de inmunoafinidad sin previa purificación por IMAC, para acortar los tiempos de obtención de la proteína pura.

Con base en los resultados de la purificación directa de TN16 por inmunoafinidad sin previa purificación por IMAC, se realizó la extracción de FN y F\_T16 siguiendo el protocolo de extracción por ultrasonicación, con la diferencia de que los botones celulares fueron resuspendidos en solución TBS 1X + lisozima (200 µg/mL) + coctel inhibidor de proteasas 1X cComplete™ (Roche), para purificar directamente por cromatografía de inmunoafinidad.

### **2.4.3 Purificación de proteínas recombinantes**

#### **2.4.3.1 Cromatografía por afinidad a metales inmovilizados**

Para purificar el primer lote de la proteína TN16 se usó el método de FPLC (fast protein liquid chromatography) con la técnica de cromatografía por afinidad a metales inmovilizados (IMAC) utilizando una columna precargada con sefarosa de níquel, la cual tiene afinidad por los anillos de imidazol, en un equipo FPLC ÄKTA pure (GE HealthCare) con el software UNICORN. El extracto de TN16 fue purificado a través de columna HisTrap FF (flujo rápido) de 5mL (GE HealthCare), con un flujo constante de 2.5 mL / min y una presión máxima de 2 MPa. Como fase móvil A se utilizó una solución de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM / NaCl 300 mM y como fase móvil B una solución  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM / NaCl 300 mM / Imidazol 250 mM, ambas soluciones a pH 8.0.

Se hizo pasar el extracto 2 veces a través de la columna, se recolectó y se identificó como FT (del inglés Flow through) se equilibró la columna con 5 mL de fase móvil 2% B / 98% A, se colectó esa fracción y se identificó como L1 (lavado 1). La elución de la proteína se llevó a cabo con 50 mL de fase móvil, usando un gradiente de solución B de 4% inicial y 100% final, cada fracción recolectada se identificó con número, posteriormente se realizó un lavado de columna con 10 mL de solución B al 100%, esa fracción corresponde al lavado 2 (L2). Todas las fracciones colectadas fueron almacenadas a 4°C para su análisis inmediato.

#### **2.4.3.2 Cromatografía por inmovinoafinidad**

En una columna de plástico con capacidad de 10 mL, se llevó a cabo la purificación con flujo por gravedad utilizando como fase estacionaria 1 mL de Pierce™ Anti-HA Agarose (Thermo Scientific), la cual tiene anclado el anticuerpo anti-HA que reconoce con alta afinidad a los aminoácidos YPYDVPDYA de la etiqueta HA presente en las proteínas TN16, FN y F\_T16. Para la elución de la proteína se utilizó una solución de TBS 1X -Tiocianato de sodio ( $\text{NaSCN}$ ) 3M. Este protocolo se llevó a cabo en un cuarto frío a 4°C.

Del VNAR TN16 previamente purificado por IMAC, se unieron las fracciones que presentaban la banda más concentrada de TN16 (resultados de western blot) y una vez acondicionada la columna tal como indica el proveedor, se pasaron a través de la columna 2 veces y el efluente fue colectado e identificado como FT, se almacenó a 4°C una muestra de 1 mL para su evaluación y el resto a -20°C. Se equilibró la columna con

10 mL de TBS 1X, después se realizó un primer lavado con 10 mL de TBST 0.05 (TBS 1X–Tween 20 0.05%), un segundo lavado se realizó con 10 mL de TBST 0.25 (TBS 1X–Tween 20 0.25%), posteriormente se realizó la elución de la proteína con 20 mL de TBS 1X-NaSCN 3M y para finalizar se realizó un tercer lavado con 10 mL de TBS 1X. Todas las fracciones fueron colectadas, la elución fue inmediatamente dializada y de cada lavado se tomó una muestra de 1 mL que fue almacenada a 4°C para su pronta evaluación, el resto se almacenó a -20°C. La columna se almacenó a 4°C con 2 mL de TBS-azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ) 0.05% como microbicida. Se procedió de esta misma manera para purificar el extracto de TN16, sin previa purificación por IMAC.

Para purificar el extracto de F\_16, sin previa purificación por IMAC, se eliminó de la columna el TBS- $\text{NaN}_3$  y se acondicionó con 10 mL de TBS, se pasó 2 veces el extracto y se colectó el efluente. Se realizó el lavado 1 con 10 mL de TBST 0.05% y el lavado 2 con 10 mL de TBST 0.25%, se eluyó con 20 mL de NaSCN 3M y se dializó inmediatamente, se realizó el tercer lavado con 10 mL de TBS. De cada lavado se tomó una muestra de 1 mL para su pronta evaluación y el resto se almacenó a -20°C, se volvió a agregar TBS- $\text{NaN}_3$  0.05% para almacenar la columna hasta su posterior uso. Se procedió de esta misma manera para purificar el extracto de FN.

#### **2.4.3.3 Diálisis**

El total de la elución con TBS 1X-NaSCN 3M fue colocado dentro de una membrana tubular SnakeSkin™ Dialysis Tubing, 3500 MWCO (Thermo Scientific), y dializado contra PBS 1X (NaCl 137 mM/ KCl 2.7 mM/  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM/  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.8 mM, pH 8.0) en una relación de volumen 20:1000 (muestra: PBS 1X). Se colocó en un agitador magnético por 2 horas a 4°C, después se realizó un recambio de PBS 1X, la membrana nuevamente se colocó en el agitador magnético por 2 horas a 4°C. Se realizó un último recambio de PBS 1X y se colocó en el agitador magnético toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se extrajo la proteína dializada y se almacenó una muestra de 1 mL a 4°C para su cuantificación en NanoDrop y evaluación por SDS-PAGE e inmunodetección, el resto se almacenó a -20°C.



#### **2.4.3.4 Evaluación de la purificación de proteínas**

Previo al análisis de las proteínas recombinantes, las muestras fueron concentradas usando el método de precipitación con ácido tricloroacético (TCA) adicionando 20  $\mu$ L de TCA por cada 100  $\mu$ L de muestra, se incubó por 20 min a 4 °C y se centrifugó durante 15 min, 14000 rpm a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 200  $\mu$ L de acetona al 100 % fría, se centrifugó en las mismas condiciones, se eliminó el sobrenadante y se realizó un segundo lavado del precipitado de la misma manera, después el botón se dejó secar y fue resuspendido en 30  $\mu$ L de solución de carga Laemmli 1X (Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS (dodecil sulfato de sodio) 4 %, glicerol 20 %,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 % y azul de bromofenol 0.004 %) finalmente las muestras fueron incubadas por 10 min a 95 °C para la completa desnaturalización de las proteínas.

##### **2.4.3.4.1 Tricina-SDS-PAGE**

El análisis se realizó utilizando la metodología de Tricina-SDS-PAGE descrita por Schägger y von Jagow (1987), la cual es comúnmente empleada para separar proteínas pequeñas (1-1,000 kDa). Se realizaron por duplicado geles de poliacrilamida al 12 %, la electroforesis se llevó a cabo durante 2 horas con amperaje constante 50 mA y voltaje máximo de 150 Volts.

Uno de los geles fue teñido con azul de Coomassie G-250, de acuerdo a lo descrito por Candiano y colaboradores (2004), durante toda la noche a temperatura ambiente y con agitación moderada (44 rpm). Posteriormente fueron desteñidos empleando una solución de desteñido (Etanol 40 % / Ácido acético 10 %). El otro gel fue empleado para realizar la inmunodetección. Para los geles a teñir se utilizó el marcador de peso molecular de proteínas de amplio rango (PROMEGA) y para los de inmunodetección se usó el marcador Precision Plus Protein™ Dual Xtra Prestained Protein Standards #1610377 (Bio-Rad Laboratories).

##### **2.4.3.4.2 Inmunodetección**

Para confirmar la presencia de las proteínas de interés, se utilizó el método de Western blot mediante la técnica de transferencia semi-seca (Harlow and Lane, 1988). Después de terminar la electroforesis, las proteínas del gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa Trans-Blot Transfer Medium de

0.45  $\mu\text{m}$  (Bio-Rad Laboratories), se realizó la transferencia utilizando una cámara de electrotransferencia Semi-Dry Electrobloetter (CLP) y solución Towbin 1X (Tris base 250 mM/ Glicina 192 mM/ Metanol 20 %, pH 8.3), se llevó a cabo con amperaje constante de 200 mA sin exceder de 20 V durante una hora.

Al finalizar, la membrana fue lavada con PBST (NaCl 137 mM/ KCl 2.7 mM/  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM/  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.8 mM y Tween-20 0.05 %, pH 7.4), se incubó en solución de bloqueo de BSA 3%-PBST durante 2 horas a temperatura ambiente (TA) con agitación moderada (44 rpm), posteriormente se enjuagó con solución PBST, se incubó con el anticuerpo anti-HA-HRP High affinity (Roche) en una dilución 1:3000 en BSA 1%-PBST durante 2 horas a TA, con agitación moderada. La membrana se lavó con PBST durante 5 min, cinco veces y finalmente, las proteínas fueron detectadas por colorimetría empleando el Kit de sustrato de DAB Pierce™ (Thermo Scientific).

## **2.4.4 Ensayos de reconocimiento de TNF $\alpha$**

### **2.4.4.1 ELISA con anticuerpo anti-HA**

Se evaluó el reconocimiento de TNF $\alpha$  por la molécula quimérica mediante un ensayo ELISA. Utilizando como control positivo a TN16 y como control negativo a FN, se colocaron 250 ng de la citocina humana recombinante TNF $\alpha$  (TNF $\alpha$  rh), por triplicado para cada proteína, en una placa de 96 pozos. La placa se incubó durante 1 h a 37°C, se descartó el antígeno y se bloqueó la placa con 200  $\mu\text{L}$  de BSA 3%-PBS 1X, incubando 1 hora a 37°C. Se eliminó la solución de bloqueo y se agregaron 50  $\mu\text{L}$ /pozo de la proteína purificada correspondiente (TN16, F\_T16 o FN), usando como blanco BSA 3%-PBS 1X, se incubó durante 1 hora a 37°C. Se descartó la solución y se agregaron 50  $\mu\text{L}$ /pozo de anticuerpo anti-HA-HRP High affinity (Roche) diluido 1:3000 en solución BSA 1%-PBS 1X, la placa se incubó por 1 hora a 37°C. Se descartó el sobrenadante y los pozos se lavaron 5 veces con 200  $\mu\text{L}$  de solución TBS 1 X-Tween 0.5 %. Finalmente se agregaron 50  $\mu\text{L}$ /pozo de sustrato TMB-ELISA 1-Step™ Turbo (Thermo Scientific), se incubó durante 15 min a 37°C y se frenó la reacción con 50  $\mu\text{L}$  ácido clorhídrico (HCl) 10%. La placa fue leída a 450 nm en un espectrofotómetro Epoch (BioTek).

#### **2.4.4.2 Análisis *in silico***

Con el objetivo de evaluar si el resultado inesperado del ensayo ELISA pudiera deberse a las etiquetas HA o 6xHis presentes en la proteína recombinante F\_T16; se solicitó un nuevo modelo *in silico* de la proteína quimérica F\_T16 incluyendo las etiquetas HA y 6XHis, para usarlo en un ensayo de interacción proteína-proteína con TNF $\alpha$ . El modelo fue nombrado F\_T16\_HA y fue construido mediante modelado por homología tal y como se indica en el punto 2.1.1.1, se realizó el análisis de interacción con TNF $\alpha$  tal como se indica en el punto 2.1.1.2 para obtener el puntaje de interacción así como los aminoácidos de F\_T16\_HA que entran en contacto con la citocina.

#### **2.4.4.3 ELISA con anticuerpo anti-6xHis**

Debido a los resultados obtenidos en el ensayo *in silico*, se realizó un nuevo ELISA de reconocimiento utilizando un anticuerpo primario anti-6xHis, para esto; se colocaron 250 ng de TNF $\alpha$  rh, por triplicado para FN, F\_T16, TN16 y un blanco, en una placa de 96 pozos. Se incubó durante 1 hora a 37°C, se descartó el antígeno y se bloqueó la placa con 200  $\mu$ L de BSA 3% -PBS 1X, incubando durante 1 hora a 37°C. Se eliminó la solución de bloqueo y se agregaron 50  $\mu$ L/pozo de la proteína purificada correspondiente (TN16, F\_T16 o FN), usando como blanco BSA 3%-PBS 1X, se incubó durante toda la noche a 4°C. Se descartó la solución y se agregaron 50  $\mu$ L/pozo de anticuerpo anti-His<sub>6</sub>-peroxidasa (Roche) diluido 1:500 en solución de BSA 1 %-PBS 1X, la placa se incubó por 1 hora a 37°C. Se descartó el sobrenadante y los pozos se lavaron 5 veces con 200  $\mu$ L de solución TBS 1X-Tween 0.5 %. Finalmente se agregaron 50  $\mu$ L/pozo de sustrato TMB-ELISA 1-Step™ Turbo (Thermo Scientific) se incubó a 37°C y después de 15 min, se frenó la reacción con 50  $\mu$ L HCl 10%. La placa fue leída a 450 nm en un espectrofotómetro Epoch (BioTek).

### **2.5 Determinación de la capacidad de neutralización**

Los ensayos que se tenían planeados para evaluar la capacidad de la proteína quimérica para neutralizar a TNF $\alpha$ , no pudieron realizarse debido a que los tiempos de experimentación se redujeron por efecto de la pandemia en curso.

Tabla 3. Resumen de metodología y resultados esperados

	META	PASO	RESULTADO OBTENIDO
ESTUDIOS PREVIOS →	Diseño <i>in silico</i> de una proteína quimérica anti- TNF $\alpha$ .	-Modelado y refinamiento -Docking con TNF $\alpha$	Proteína F_T16 con mayor reconocimiento por TNF $\alpha$ que su VNAR parental TN16
OBJETIVO	META	PASO	RESULTADO ESPERADO
1. OBTENER LA PROTEÍNA RECOMBINANTE F_T16	Construcción de plásmido recombinante.	Diseño de genes FN y F_T16	-Genes sintéticos para expresión de FN y F_T16 en <i>E. coli</i>
		Preparación de insertos	-Stock de los genes sintéticos - Insertos FN y F_T16 listos para ligación con vector
		Digestión de pET28a	Vector listo para ligación con insertos
		Ligación	Plásmidos recombinantes pET28a-FN y pET28a-F_T16
	Expresión de proteínas FN y F_T16	Sistemas de expresión	SHuffle- pET28a-FN y SHuffle- pET28a-F_T16
		Expresión a pequeña escala	Proteínas recombinantes FN y F_T16
2. DETERMINAR LA CAPACIDAD DE RECONOCIMIENTO DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA POR TNF $\alpha$	Obtener TN16, F_T16 y FN para ensayos <i>in vitro</i>	Sistema de expresión TN16	BL21-Pcomb3X-TN16
		Expresión a gran escala	Extractos de las proteínas recombinantes TN16, F_T16 y FN
		Purificación de proteínas	Proteínas puras TN16, F_T16 y FN
	Ensayos de reconocimiento	ELISA con anticuerpo anti-HA	Reconocimiento de F_T16 por TNF $\alpha$
		Ensayo <i>in silico</i> adicional	Falta de reconocimiento de F_T16 debido a las etiquetas HA y 6xHis
		ELISA con anticuerpo anti-6xHis	Reconocimiento de F_T16 por TNF $\alpha$
3. COMPROBAR LA CAPACIDAD DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA PARA NEUTRALIZAR TNF $\alpha$	Ensayos <i>in vivo</i> para evaluar la capacidad	No se realizaron ensayos	No se realizaron ensayos

## Capítulo 3. Resultados

---

Partiendo de la secuencia reportada para FN y la diseñada para F\_T16, que en ensayos *in silico* demostró mayor reconocimiento por TNF $\alpha$  que su VNAR parental TN16; se obtuvieron los genes sintéticos para expresar de manera recombinante la quimera (F\_T16) y el andamio (FN).

En la obtención de las proteínas recombinantes, el principal logro fue la construcción de sus plásmidos recombinantes bajo condiciones muy específicas y mediante la adición de un paso previo a la ligación. Se obtuvieron los sistemas de expresión para F\_T16 y FN se evaluaron mediante una expresión a pequeña escala.

El VNAR TN16 fue expresado en células BL21 y, parcialmente purificado, se utilizó como control positivo en los ensayos de reconocimiento por TNF $\alpha$ . Las proteínas FN y F\_T16 fueron expresadas a gran escala en células SHuffle y parcialmente purificadas antes de los ensayos de reconocimiento. El ELISA de reconocimiento usando un anticuerpo primario anti-HA no coincidió con los resultados que se obtuvieron *in silico*, en consecuencia, se solicitó un ensayo *in silico* adicional para evaluar la interacción de TNF $\alpha$  con el nuevo modelo F\_T16\_HA, los resultados fueron inesperados debido a que se observó que la quimera reconoce a TNF $\alpha$  usando los aminoácidos de la etiqueta HA y no los del CDR3, y resultó también que tiene mejor reconocimiento que el receptor natural de TNF $\alpha$  (TNFR2). El ELISA de reconocimiento empleando un anticuerpo anti-6xHis confirmó los resultados del nuevo ensayo *in silico*.

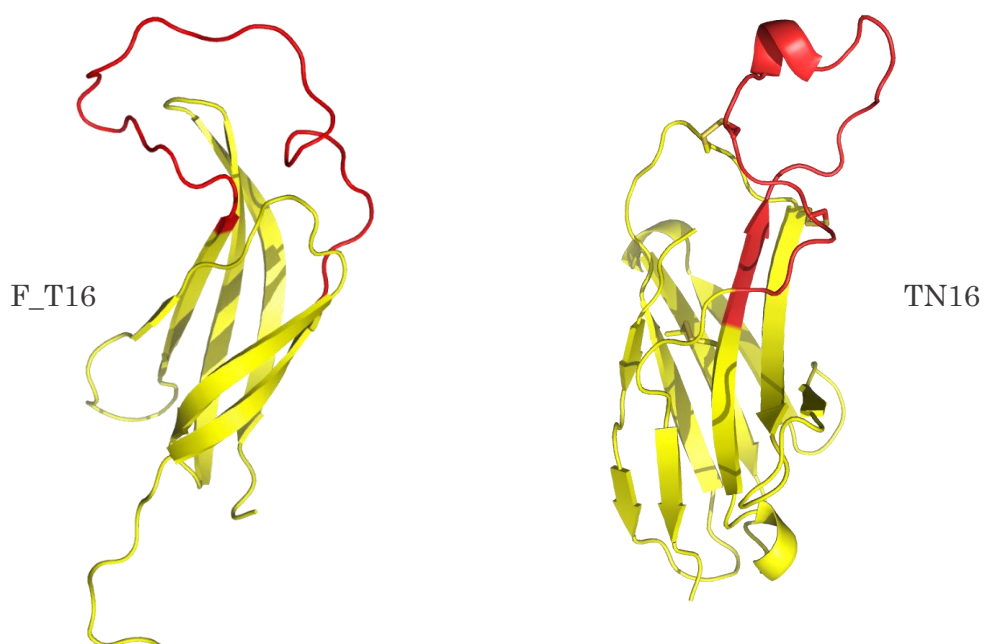
La comprobación de la capacidad de la proteína quimérica para neutralizar a TNF $\alpha$  no pudo ser realizada, debido a la extensión que alcanzó la comprobación del reconocimiento de la proteína por TNF $\alpha$ , y a que los tiempos de experimentación se vieron reducidos por efecto de la pandemia en curso.

### 3.1 Análisis *in silico*

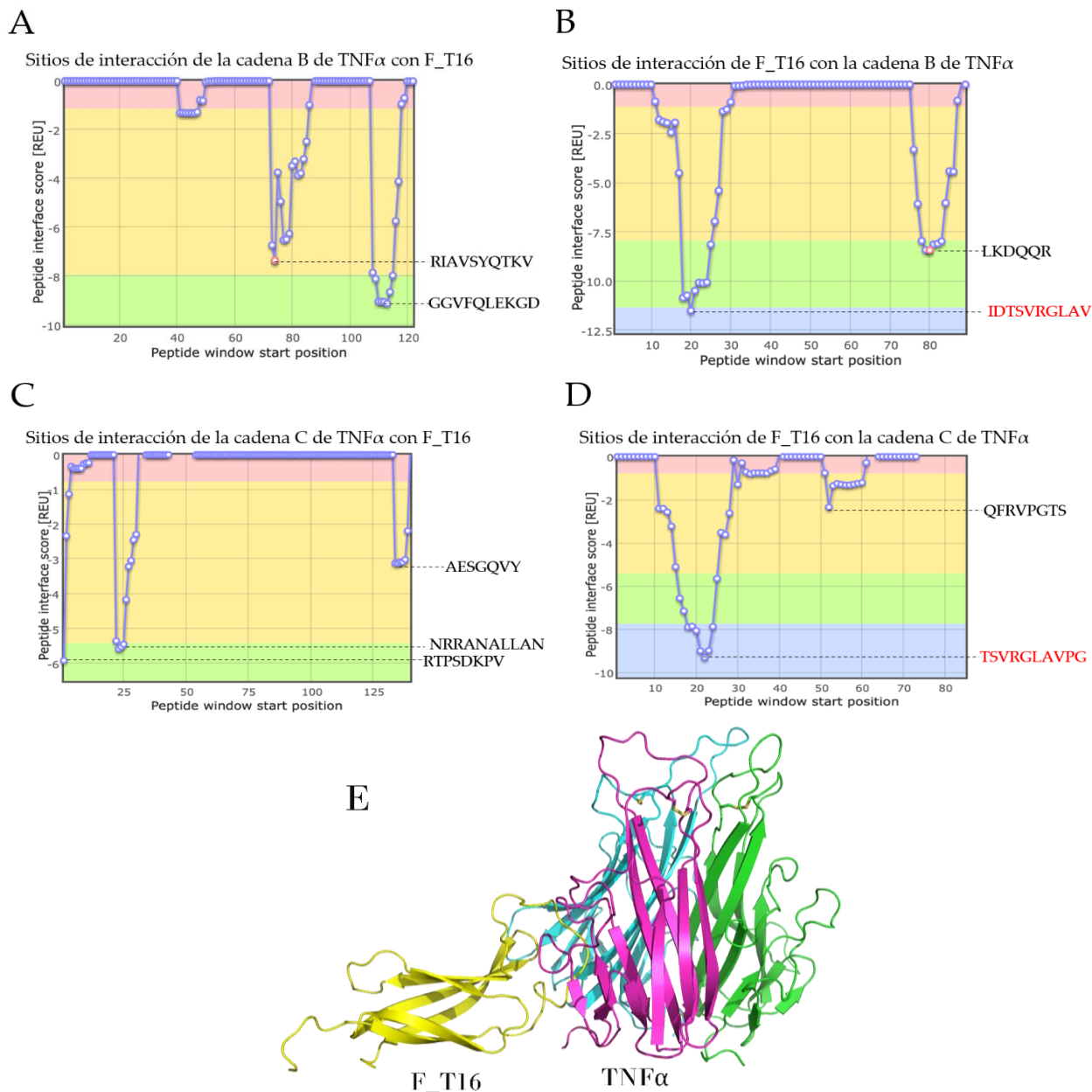
Se realizó el modelado por homología de la proteína quimérica, obteniendo un buen modelo para F\_T16 con valores de RMSD estables a partir de los 5 ns, y 90.8 % de los residuos en regiones altamente favorecidas en el gráfico de Ramachandran. El modelo de TN16 dio valores estables de RMSD partir de 14

ns y 92.3 % de los residuos en regiones altamente favorecidas en el gráfico de Ramachandran, estos modelos se utilizaron en el análisis de interacción proteína-proteína con TNF- $\alpha$  (figura 7).

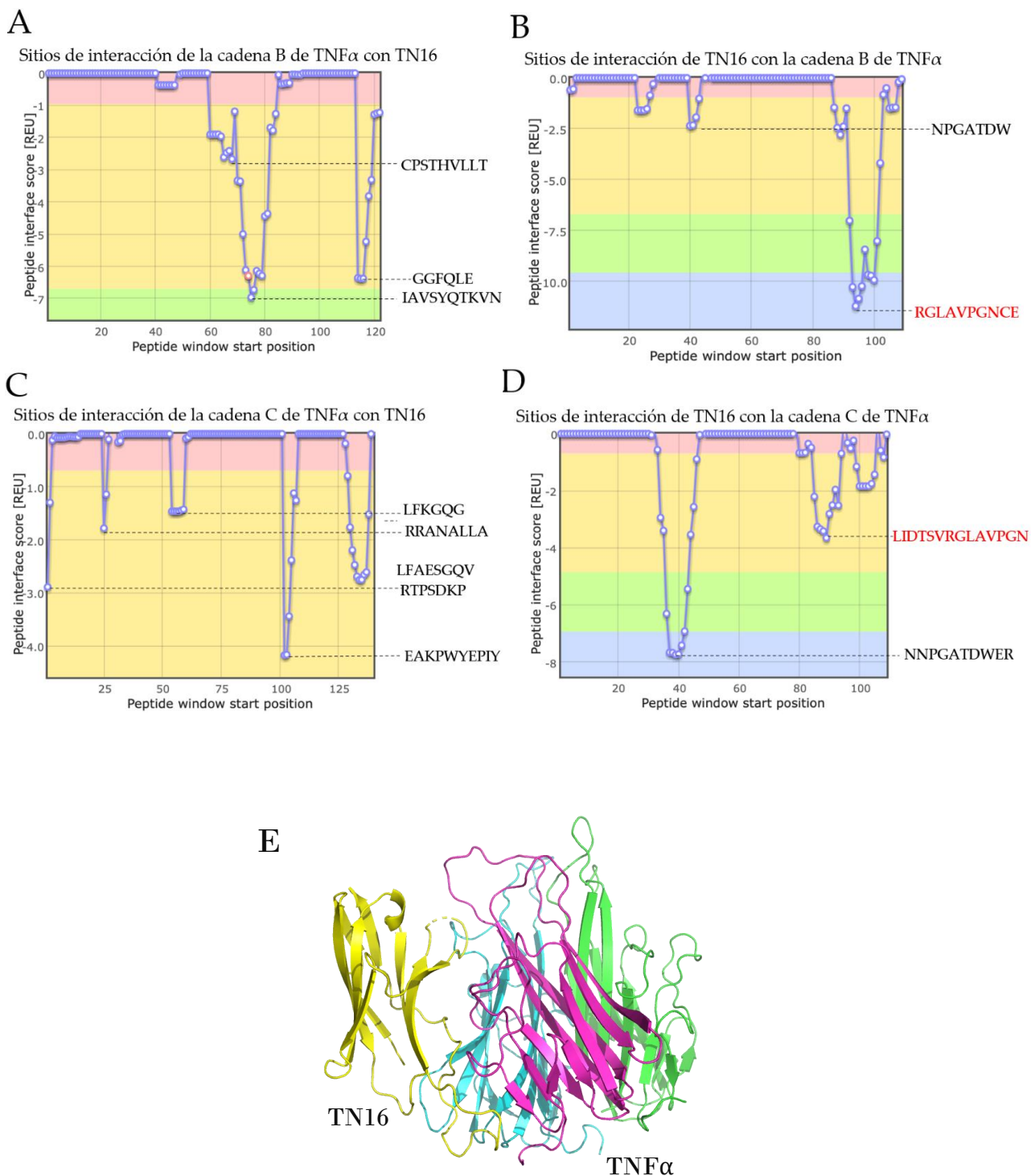
En la interacción proteína-proteína, el control positivo (TNF $\alpha$ / TNFR2) tuvo un puntaje de -39.78 REU, para la interacción de TNF $\alpha$  con F\_T16 se obtuvo un puntaje total de -38.21 REU siendo mejor que el de TN16 que fue igual a -33.01 REU. Lo que indica un mejor reconocimiento por parte de F\_T16 en comparación con su parental TN16. En las figuras 8 y 9 se observa la interacción del CDR3 de las proteínas con las cadenas B y C del TNF $\alpha$ . Y en la figura 10 se aprecia la unión de un monómero de TNFR2 con las cadenas A y B de su antígeno.



**Figura 7.** Modelos *in silico* F\_t16 y TN16. En color rojo se observa la región que pertenece al CDR3. Fuente: M.C. Salvador Dueñas Espinoza usando ClusPro.

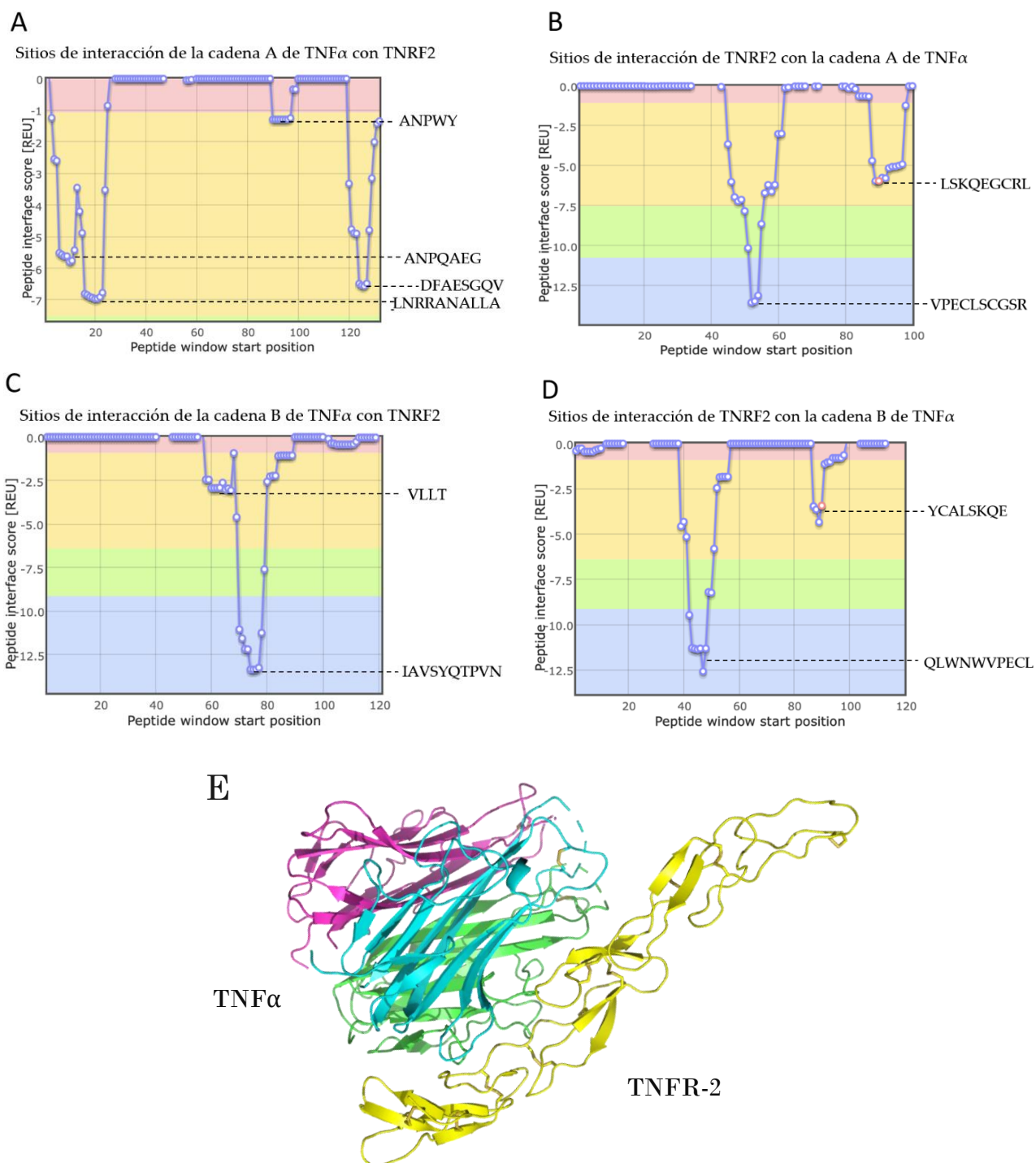


**Figura 8.** Interacción proteína-proteína TNF $\alpha$  / F\_T16. Los gráficos A y C corresponden a las regiones de TNF $\alpha$  que interactúan con F\_T16. En el gráfico B se muestran las interacciones de F\_T16 con la cadena B de TNF $\alpha$ , en el gráfico D las que entran en contacto con la cadena C, los aminoácidos en rojo corresponden al CDR3. La figura E corresponde al modelo *in silico* de la interacción entre el CDR3 de F\_T16 (en amarillo) y las cadenas B y C de TNF $\alpha$  (cian y rosa). Fuente: M.C. Salvador Dueñas Espinoza usando ClusPro y Peptiderive



**Figura 9.** Interacción proteína-proteína TNF $\alpha$  / TN16. Los gráficos A y C corresponden a las regiones de TNF $\alpha$  que entran en contacto con el VNAR TN16. En el gráfico B se muestran las interacciones entre TN16 y la cadena B de TNF $\alpha$ , en el gráfico D las del VNAR con la cadena C del antígeno, los aminoácidos en rojo corresponden al CDR3. La figura E corresponde al modelo del complejo TNF $\alpha$  / TN16 en el que se muestran las cadenas A, B y C de TNF $\alpha$  en color verde, cian y rosa respectivamente, y el VNAR coloreado en amarillo. Fuente: M.C. Salvador Dueñas Espinoza usando ClusPro y Peptiderive.





**Figura 10.** Interacción proteína-proteína TNF $\alpha$  / TNRF2. Los gráficos A y C corresponden a las regiones de TNF $\alpha$  que entran en contacto con su receptor natural TNRF2. En el gráfico B se muestran las interacciones entre TNRF2 y la cadena A de TNF $\alpha$ , en el gráfico D las del receptor con la cadena B. La figura E corresponde al modelo del complejo TNF $\alpha$  / TNRF2, diseñado por homología, en el que se muestran las cadenas A, B y C de TNF $\alpha$  en colores verde, cian y rosa respectivamente, y en amarillo el receptor TNFR2. Fuente: M.C. Salvador Dueñas Espinoza usando ClusPro y Peptiderive.

## 3.2 Plásmidos recombinantes

### 3.2.1 Genes FN y F\_T16

Se diseñaron los genes necesarios para expresar de manera recombinante las proteínas FN y F\_T16. El gen diseñado para expresar el dominio 15 del módulo III de la fibronectina humana (FN), consta de 308 pb y su secuencia de aminoácidos es la siguiente:

MANASTGQEALSQTTISWAPFQDTSEYIISCHPVGTDDEEPLQFRVPGTSTSATLTGLTRGATYNIIVEALKDQQRHKVREE  
VVTVGNSGAYPYDVPDYASLE

El gen diseñado para expresar la proteína quimérica F\_T16 consta de 344 pb y su secuencia de aminoácidos es la siguiente:

MANASTGQEALSQTTILIDTSVRGLAVPGNAERASSYHYIISCHPVGTDDEEPLQFRVPGTSTSATLTGLTRGATYNIIVEAL  
KDQQRHKVREEVVTVGNSGAYPYDVPDYASLE

En color naranja se muestra el sitio de restricción NcoI, el CDR3 de TN16 está resaltado en color cian, en azul se encuentran 10 aminoácidos de la etiqueta de hemaglutinina de la influenza humana, en color rojo los aminoácidos que forman el linker entre la proteína y la etiqueta HA, en verde el sitio XhoI, el resto de los aminoácidos no resaltados corresponden al dominio 15 del módulo III de la fibronectina humana.

### 3.2.2 Resultados de la amplificación de pUCIDT-AMP-FN y pUCIDT-AMP-F\_T16

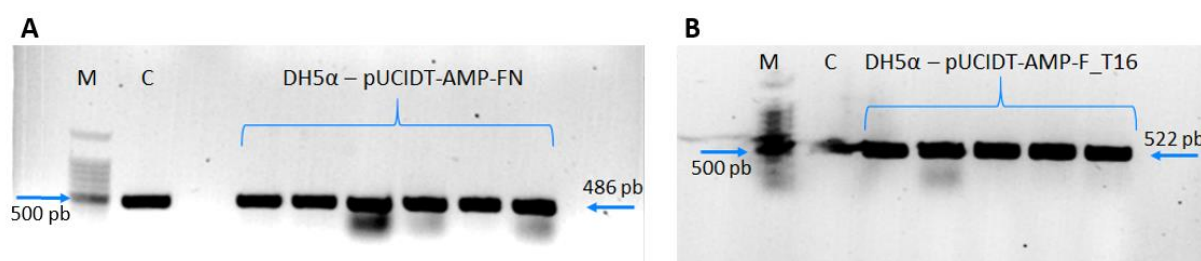
Los genes sintéticos fueron proporcionados por el proveedor IDT como pUCIDT-AMP-FN y pUCIDT-AMP-F\_T16, se amplificaron en células DH5 $\alpha$  y se comprobó la transformación exitosa mediante PCR, observando la banda de interés de 482 pb para las clonas con pUCIDT-AMP-FN y de 518 pb para las de pUCIDT-AMP-F\_T16 (figura 11). Los plásmidos amplificados fueron purificados por lisis alcalina a baja escala obteniendo valores de pureza de 1.80 a 1.87 (tabla 4), encontrándose dentro del rango aceptable de 1.80 – 2.00, y se evaluaron en un gel de agarosa 1% comparándolos con el plásmido proporcionado por el proveedor.

En el carril 1 de la figura 12 se observa la presencia de un fragmento de ~4000 pb, el cual corresponde al plásmido pUCIDT-AMP-FN que nos envió el proveedor y que utilizamos como control positivo, en los

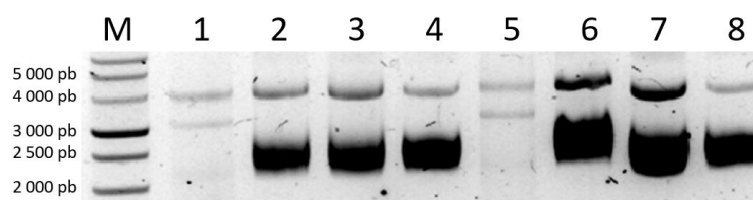
carriles 2, 3 y 4 se muestran los plásmidos pUCIDT-AMP-FN purificados por lisis alcalina. Lo que indica, que ambos plásmidos corresponden a pUCIDT-AMP-FN. En el carril 5 se muestra el control positivo para pUCIDT-AMP-F\_T16, y en los carriles 6, 7 y 8 se muestra el plásmido pUCIDT-AMP-F\_T16 purificado por lisis alcalina, demostrando así, que ambos plásmidos corresponden a pUCIDT-AMP-F\_T16 (figura 12).

**Tabla 4.** Resultados espectrofotométricos de pUCIDT-AMP-FN y pUCIDT-AMP-F\_T16

Plásmido	A260/A280	A260	ng/ $\mu$ L	Volumen
pUCIDT-AMP-FN 1	1.87	40.620	2031.0	100 $\mu$ L
pUCIDT-AMP-FN 2	1.85	33.507	1675.3	100 $\mu$ L
pUCIDT-AMP-FN 3	1.85	42.475	2123.8	100 $\mu$ L
pUCIDT-AMP-F_T16 1	1.82	44.467	2223.3	100 $\mu$ L
pUCIDT-AMP-F_T16 2	1.87	46.566	2328.3	100 $\mu$ L
pUCIDT-AMP-F_T16 3	1.80	39.568	1978.4	100 $\mu$ L



**Figura 11.** PCR de colonias DH5 $\alpha$  pUCIDT-AMP-FN y pUCIDT-AMP-F\_T16. En el carril M se cargó el marcador molecular de 100 pb (PROMEGA), **A)** C: PCR de pUCIDT-AMP-FN del proveedor, enseguida PCR de colonias aisladas con amplicón pUCIDT-AMP-FN de 486 pb **B)** C: PCR de pUCIDT-AMP-F\_T16 del proveedor, el resto corresponden a las colonias aisladas con amplicón pUCIDT-AMP-F\_T16 de 522 pb.



**Figura 12.** Lisis alcalina de pUCIDT-AMP-FN y pUCIDT-AMP-F\_T16. En el carril M se cargó el marcador molecular de 1kb (PROMEGA), 1: pUCIDT-AMP-FN del proveedor, carriles 2-4: PUCIDT-AMP-FN amplificado, 5: pUCIDT-AMP-F\_T16 del proveedor, carriles 6-8: pUCIDT-AMP-F\_T16 amplificado. Se observan las formas; circular abierta, circular relajada y superenrollada para los 2 controles, mientras que para los plásmidos purificados por lisis alcalina no se logra distinguir la forma relajada de la superenrollada.

### 3.2.3 Resultados de la digestión de pUCIDT-AMP-FN y pUCIDT-AMP-F\_T16

Se usaron los plásmidos obtenidos por lisis alcalina para realizar PCR, sus amplicones se purificaron, se cuantificaron (tabla 5) y se digirieron simultáneamente con las enzimas de restricción NcoI y XhoI. Después de la digestión, se purificaron por corte de banda obteniendo 1.95 µg de FN y 1.53 µg de F\_T16 (tabla 6) listos para su clonación en el vector pET28a. A partir de 8 µg de material genético para digestión, se obtuvo un rendimiento de 24.4% para FN y 19.1% para F\_T16.

En la figura 13, se observa la doble digestión en los fragmentos de 308 pb para FN (carril 3) y 344 pb para F\_T16 (carril 6) que posteriormente fueron cortados y purificados mediante el kit 'QIAquick Gel extraction' (QIAGEN). En esos mismos carriles, los fragmentos de 72 y 106 pb corresponden a los extremos del vector pUCIDT escindidos por NcoI y XhoI respectivamente. Los carriles 1, 2, 3 y 4 se usaron como controles negativos de digestión, comprobando así que se logró digerir los productos de PCR de los plásmidos pUCIDT-AMP-FN y pUCIDT-AMP-F\_T16.

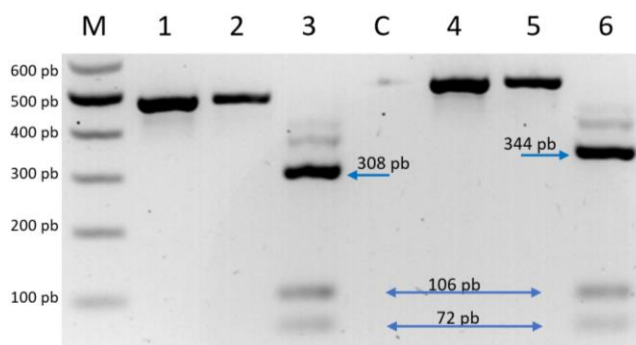
La figura 14 muestra los insertos no digeridos de FN (486 pb) y de F\_T16 (522 pb), en los carriles 1 y 3 respectivamente, que se usaron como control negativo de digestión. Los insertos digeridos y purificados de los carriles 2 y 4, muestran sólo los fragmentos para FN (308 pb) y para F\_T16 (344 pb). Estos resultados nos indican la correcta digestión de FN y de F\_T16 con las enzimas NcoI y XhoI, así como, la correcta purificación ya que no se observa la presencia de los fragmentos de 76 y 106 pb.

**Tabla 5.** Resultados espectrofotométricos de PCR de pUCIDT-AMP-F\_T16 y pUCIDT-AMP-FN

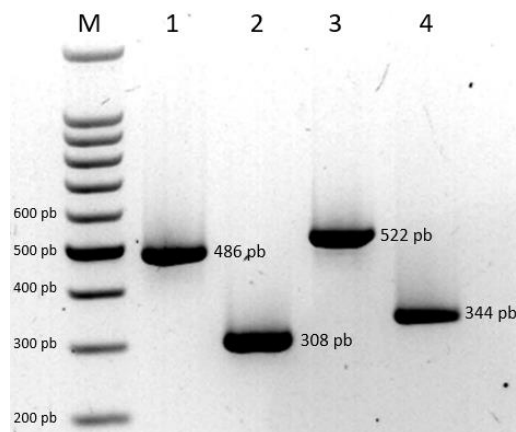
Producto de PCR	A260/A280	A260	ng/µL	Volumen	Total
pUCIDT-AMP-FN 1	1.75	2.981	149.0	30 µL	4.47 µg
pUCIDT-AMP-FN 2	1.84	2.509	125.5	30 µL	3.77 µg
pUCIDT-AMP-F_T16 1	1.85	2.855	142.8	30 µL	4.28 µg
pUCIDT-AMP-F_T16 2	1.83	3.262	163.1	30 µL	4.89 µg

**Tabla 6.** Resultados espectrofotométricos F\_T16 y FN digeridos y purificados

Inserto	A260/A280	A260	ng/µL	Volumen	Total
FN	1.84	1.303	65	32 µL	1.95 µg
F_T16	1.85	1.023	51	32 µL	1.53µg



**Figura 13.** pUCIDT-AMP-FN y pUCIDT-AMP-F\_T16 digeridos. M: Marcador molecular 100 pb (PROMEGA), 1: Producto de PCR de PUCIDT-AMP-FN no digerido y no purificado, 2: Producto de PCR de pUCIDT-AMP-FN purificado no digerido, 3: Producto de PCR de pUCIDT-AMP-FN digerido, C: Control negativo de PCR, 4: Producto de PCR de PUCIDT-AMP-F\_T16 no digerido y no purificado, 5: Producto de PCR de PUCIDT-AMP-F\_T16 purificado no digerido, 6: Producto de PCR de PUCIDT-AMP-F\_T16 digerido.



**Figura 14.** Insertos purificados FN y F\_T16. M: Marcador molecular 100 pb (PROMEGA), carril 1: Producto de PCR de pUCIDT-AMP-FN no digerido, carril 2: FN digerido y purificado de banda. Carril 3: Producto de PCR de pUCIDT-AMP-F\_T16 no digerido, carril 4: F\_T16 digerido y purificado de banda.

### 3.2.4 Resultados de la digestión del vector de expresión pET28a

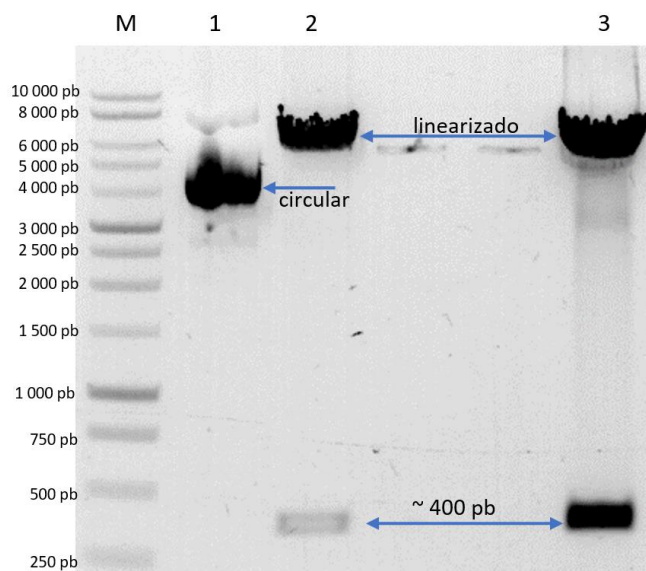
La digestión de pET28a se llevó a cabo de la misma manera que la de los insertos, después se precipitó con isopropanol para su concentración y finalmente se purificó mediante el corte de banda de un gel de agarosa. Se obtuvo un rendimiento final de 26.6 %, ya que a partir de 5  $\mu$ g de pET28a sin digerir se obtuvieron 1.33  $\mu$ g de plásmido digerido y purificado, con una pureza de 1.75, que aunque no es lo ideal se consideró apto para la ligación. Se observó una pérdida del 58% del material digerido durante la purificación por corte de banda, ya que después de la precipitación con isopropanol se recuperaron 3.17  $\mu$ g y al final de la purificación sólo se recuperaron 1.33  $\mu$ g (tabla 7).

En la figura 15 se observa el producto de la digestión en los carriles 2 y 3 con una banda de 400 pb que corresponde al fragmento escindido por las enzimas NcoI y XhoI y a la altura de ~7 Kb se encuentra el vector linearizado por acción de las enzimas de restricción. En el carril 1 se observa la forma circular de pET28a entre las 4 y 5 Kb, correspondiente al control negativo de la digestión. Esto comprueba la correcta digestión de pET28a con las enzimas NcoI y XhoI.

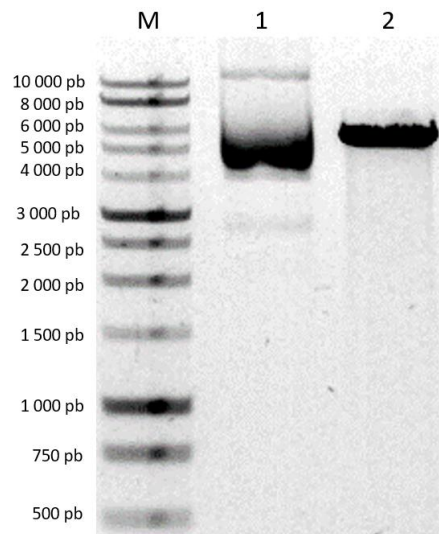
Se cortó el vector linearizado del carril 3 que se muestra en la figura 15, se purificó usando el kit 'QIAquick Gel extraction' (QIAGEN), y se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa (figura 16) comparándose contra pET28a sin digerir (carril 1), en el carril 2 se observa la banda de pET28a digerido sin la presencia del fragmento de 400 pb. Comprobando así la correcta purificación del vector pET28a digerido.

**Tabla 7.** Resultados espectrofotométricos de pET28a.

pET28a	A260/A280	A260	ng/ $\mu$ L	Volumen	TOTAL
Sin digerir	1.80	8.767	434	-	-
Digerido precipitado con isopropanol	1.60	2.882	144.1	22 $\mu$ L	3.17 $\mu$ g
Purificado de banda	1.75	0.888	44.4	30 $\mu$ L	1.33 $\mu$ g



**Figura 15.** Evaluación del vector de expresión digerido. M: Marcador molecular 1 Kb (PROMEGA), carril 1: pET28a sin digerir [434 ng], carril 2: pET28a digerido [~288 ng], carril 3: pET28a (+) digerido [~4323 ng].



**Figura 16.** Evaluación del vector de expresión digerido y purificado. M: Marcador molecular 1 Kb (Promega), carril 1: pET28a sin digerir [129 ng], carril 2: pET28a digerido y purificado [111 ng].

### 3.2.5 Resultados de la ligación

Previo a las reacciones de ligación, se evaluó el vector pET28a digerido y purificado, mediante una reacción de ligación sin ningún inserto, mencionado como control de autoligación, en el que no se observó crecimiento, lo que indica que pET28a puede ser usado en las reacciones de ligación con FN y F\_T16. Para evaluar las células electrocompetentes a ser transformadas con los productos de ligación, se empleó un control de transformación que consistió en células ER2738 electrocompetentes, transformadas con pET28a sin digerir. El control de transformación presentó crecimiento incontable en placa, demostrando que las células empleadas fueron eficientes.

Con respecto a las 5 reacciones de ligación que se llevaron a cabo para cada inserto, bajo las condiciones mencionadas en la tabla 2, no hubo crecimiento en los cultivos en placa pero sí, en los cultivos líquidos de algunas reacciones.

Para pET28a-F\_T16 sólo se observó crecimiento en el cultivo líquido de la reacción 5 y el control de transformación, los productos de PCR de esos cultivos líquidos (figura 17A) mostraron el fragmento de interés (522 pb) que corresponde al amplicón de pET28a-F\_T16 (carril 1), y el fragmento de 570 pb de pET28a sin digerir (carril 2), empleado como control positivo de PCR.

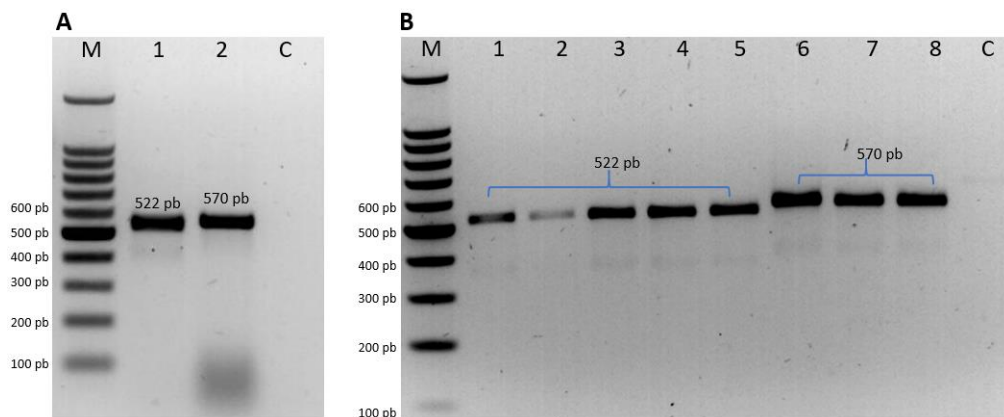


Se aislaron colonias a partir de esos 2 cultivos líquidos y se realizó PCR de colonia. Los productos de PCR de las colonias aisladas a partir del cultivo líquido de la reacción 5 (figura 17B), mostraron presencia del fragmento de 522 pb en los carriles 1-5, mientras que la banda de 570 pb correspondiente a pET28a sin digerir, se encontró en los productos de PCR de las colonias aisladas a partir del cultivo líquido del control de transformación (carriles 6-8). Esto indica una ligación exitosa para la reacción 5 de pET28a-F\_T16.

Para pET28a-FN se observó crecimiento en los cultivos líquidos de las 5 reacciones, los productos de PCR (figura 18) mostraron el fragmento de interés de 486 pb solo para las reacciones 4 y 5. En el carril 6, se observa el amplicón de pET28a con 570 pb y el de pET28a-F\_T16 con 522 pb (carril 7), usados como controles positivos. En el carril 3, se observa un fragmento de 590 pb que no corresponde a ninguno de los plásmidos evaluados, sin embargo se aislaron colonias de ese cultivo para evaluarlo una vez más. Se aislaron colonias de los cultivos 4 y 5 que presentaron el fragmento de 486 pb.

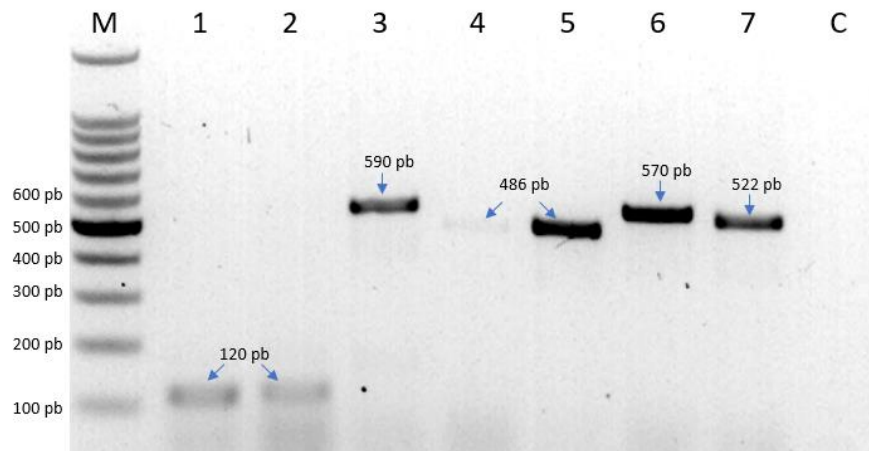
El fragmento de interés (486 pb) se encontró en las células aisladas del cultivo 5 (carriles 7, 8 y 9 de la figura 19). Los amplicones provenientes de la reacción de ligación 3 presentan bandas inespecíficas que pudieran pertenecer a dímeros de oligonucleótidos, carriles 1-3. Esto indica una ligación exitosa solamente para la reacción 5 de pET28a-FN.

Las condiciones de la reacción de ligación 5 fueron las siguientes: previa linearización siguiendo la recomendación de Sambrook y colaboradores, uso de solución tampón de rápida ligación 2X, incubación a 15°C durante 15 horas.

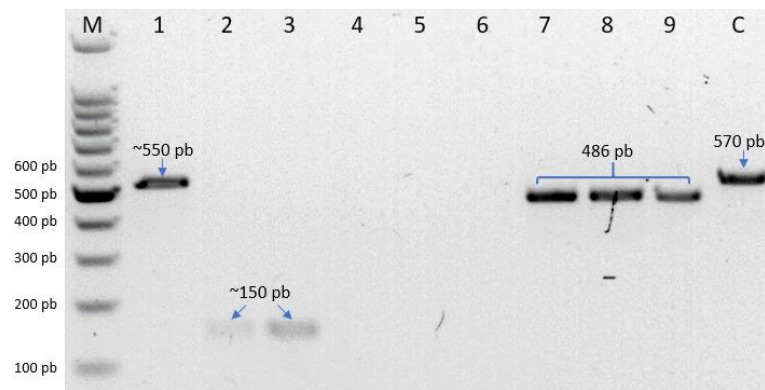


**Figura 17.** PCR pET28a-F\_T16. M: Marcador molecular 100 pb (Promega) C: control negativo de PCR, A) PCR de cultivo líquido, carril 1: cultivo de células transformadas con la ligación pET28a-F\_T16, carril 2: cultivo de células transformadas con pET28a sin digerir. B) PCR de colonia, carriles 1-5: colonias aisladas transformadas con la ligación pET28a-F\_T16, carriles 6-8: colonias aisladas de pET28a sin digerir.





**Figura 18.** PCR cultivo líquido pET28a-FN. M: Marcador molecular 100 pb (Promega), carriles 1-5: cultivos del producto de ligación pET28a-FN de las reacciones 1,2,3,4 y 5 respectivamente. Carril 6: control de transformación (pET28a sin digerir), carril 7: PCR de colonia pET28a-F\_T16, C: control negativo de PCR.

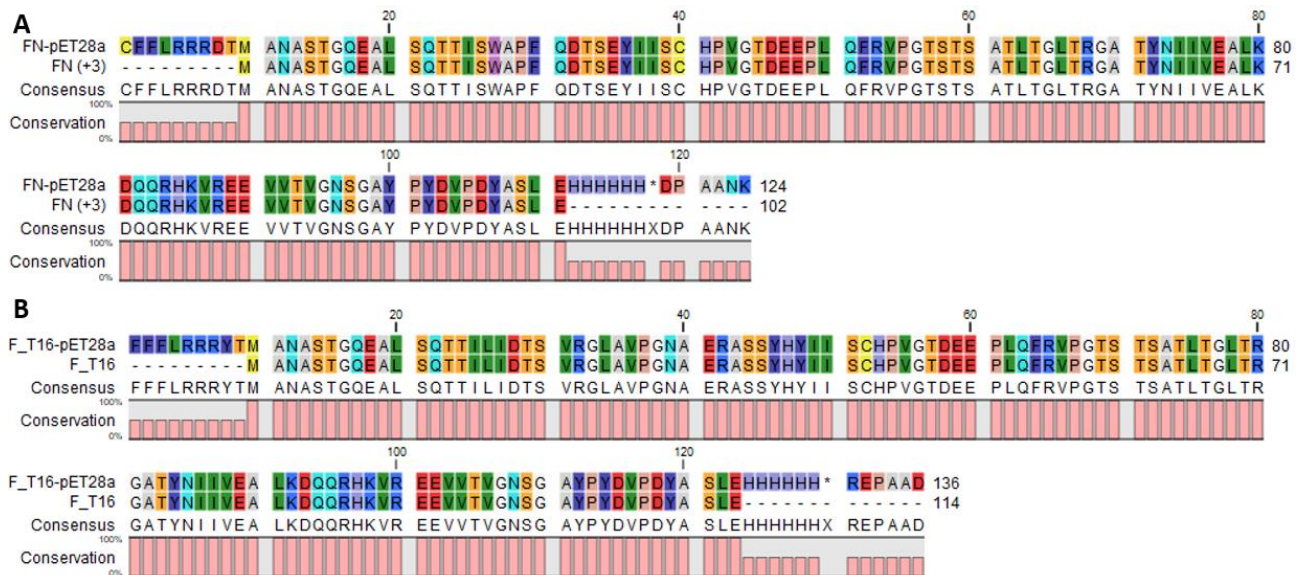


**Figura 19.** PCR de colonia pET28a-FN. M: Marcador molecular 100 pb (Promega), carriles 1-3: ligación a 37°C, carriles 4-6: ligación a 4°C con previo tratamiento a 45°C. Carriles 7-9: ligación a 15°C con previo tratamiento a 45°C. C: colonia transformada con pET28a sin digerir (control positivo de PCR).

### 3.2.6 Resultados de la secuenciación

Los productos de PCR positivos a los fragmentos de interés (486 pb para FN y 522 pb para F\_T16) fueron secuenciados por el laboratorio SeqXcel, Inc. (San Diego, CA, E.U.A), las secuencias obtenidas se analizaron en el programa CLC Main Work Bench 8.1.3 (CLC bio, QIAGEN) traduciéndo las a aminoácidos y alineándolas con las secuencias de los genes sintéticos F\_T16 y FN. Todas las secuencias presentaron un porcentaje de identidad mayor a 85%, la secuencia de la clona 2 de pET28a-F\_T16 fue la que presentó mayor coincidencia con el gen F\_T16 y la de la clona 7 de pET28a-FN con el gen FN, estas 2 secuencias se analizaron

detalladamente; se encontraron 10 aminoácidos cambiados para la secuencia pET28a-FN con respecto a su gen y 15 para pET28a-F\_T16. Se identificaron los nucleótidos que no coincidían con la secuencia del gen sintético y uno a uno se fueron revisando en el cromatograma de la secuenciación, se corrigieron los nucleótidos que habían sido leídos erróneamente por el secuenciador. Después de limpiar las secuencias, se realizó nuevamente la traducción a aminoácidos y se obtuvo un 100% de identidad de los plásmidos recombinantes con sus genes correspondientes. En la figura 20A se aprecian los 88 aminoácidos (Aa's) del andamio FN, más los sitios de restricción traducidos, la etiqueta HA, y la etiqueta 6xHis seguida del codón de paro. En la figura 20B se observan los 98 Aa's de F\_T16, seguidos de los 10 Aa's de la etiqueta HA, flanqueados por los sitios de restricción traducidos, enseguida hacia el carboxilo terminal se encuentran las 6 histidinas y el codón de paro.



**Figura 20.** Análisis de secuencias traducidas pET28a-FN y pET28a-F\_T16. A) Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de pET28a-FN con la del gen FN. B) Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de pET28a-F\_T16 con la del gen F\_T16.

### 3.3 Proteínas recombinantes

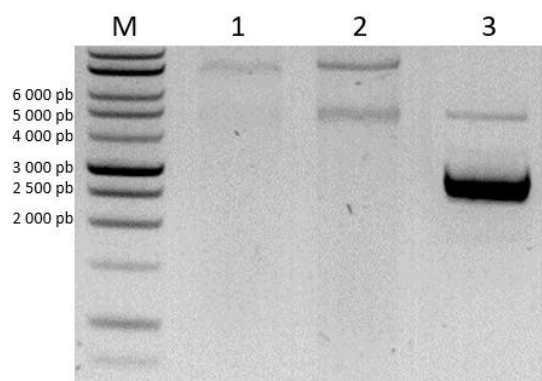
#### 3.3.1 Sistema de expresión

Una vez que se confirmó la correcta clonación de los plásmidos recombinantes pET28a\_FN y pET28a-F\_T16, se amplificaron, se purificaron por lisis alcalina, se cuantificaron por espectrofotometría y se evaluaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se obtuvo una pureza de 1.86 para ambos plásmidos (tabla 7), y en el gel de agarosa se observó la forma circular del plásmido pET28a-FN en el carril 1, y en el carril 2 la de pET28a-F\_T16, ambos alrededor de las 5 Kb, en el carril 3 se observa el control positivo pET28a. Con estos resultados se procedió a introducir los plásmidos en células SHuffle para proceder con la expresión de las proteínas FN y F\_T16.

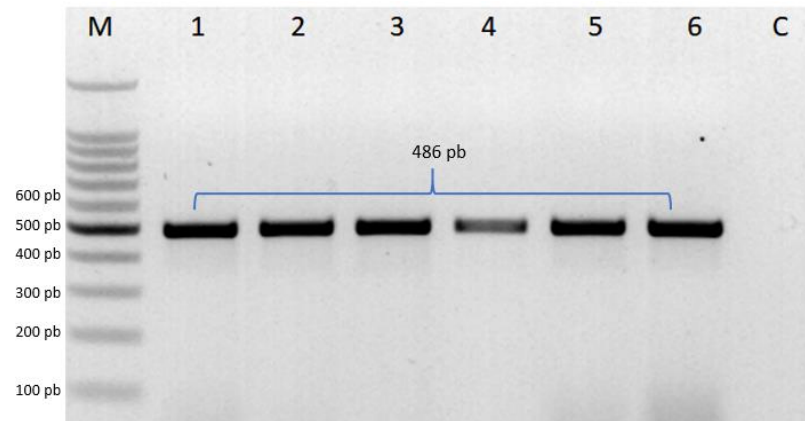
Para corroborar la introducción de los plásmidos en las células SHuffle, se realizó PCR de colonias aisladas, observando el fragmento de 486 pb para pET28a\_FN y 522 pb para pET28a-F\_T16 en las figuras 22 y 23 respectivamente. En la figura 23 se observa el fragmento de 570 pb para el control positivo pET28a. Esto confirmó la correcta transformación de células SHuffle y pudo procederse con la expresión a pequeña escala de las proteínas recombinantes FN y F\_T16.

**Tabla 8 .** Resultados espectrofotométricos de pET28a-FN y pET28a-F\_T16.

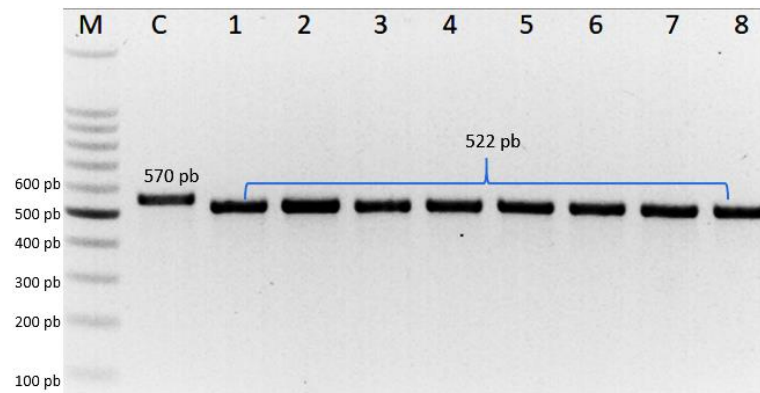
Después de lisis alcalina	260/280	Abs 260	[ng/ $\mu$ L]	VOLUMEN
pET28a-F_T16	1.86	56.869	2842.5	42 $\mu$ L
pET28a-FN	1.86	25.838	1291.9	42 $\mu$ L



**Figura 21.** Plásmidos recombinantes purificados por lisis alcalina. M: Marcador molecular 1 Kb (PROMEGA), carril 1: pET28a-F\_T16, carril 2: pET28a-FN, carril 3: pET28a.



**Figura 22.** PCR de colonias SHuffle-pET28a-FN, M: Marcador molecular 100 pb (PROMEGA) carriles 1-6: colonias SHuffle-pET28a-FN, C: Control negativo de PCR.



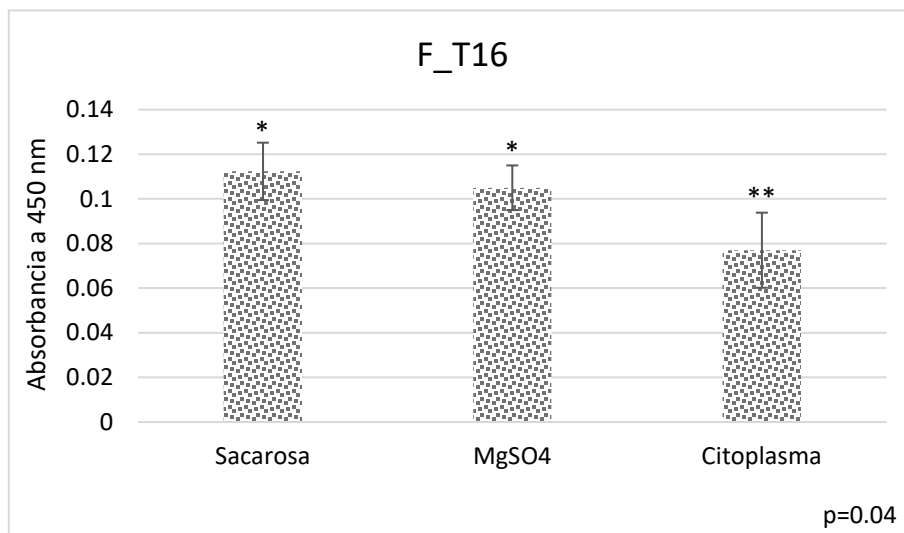
**Figura 23.** PCR de colonias SHuffle-pET28a-F\_T16. M: Marcador molecular 100 pb (PROMEGA), C: Control positivo (pET28a sin inserto) carriles 1-8: colonias SHuffle-pET28a-F\_T16.

### 3.3.2 Resultados de ELISA de expresión

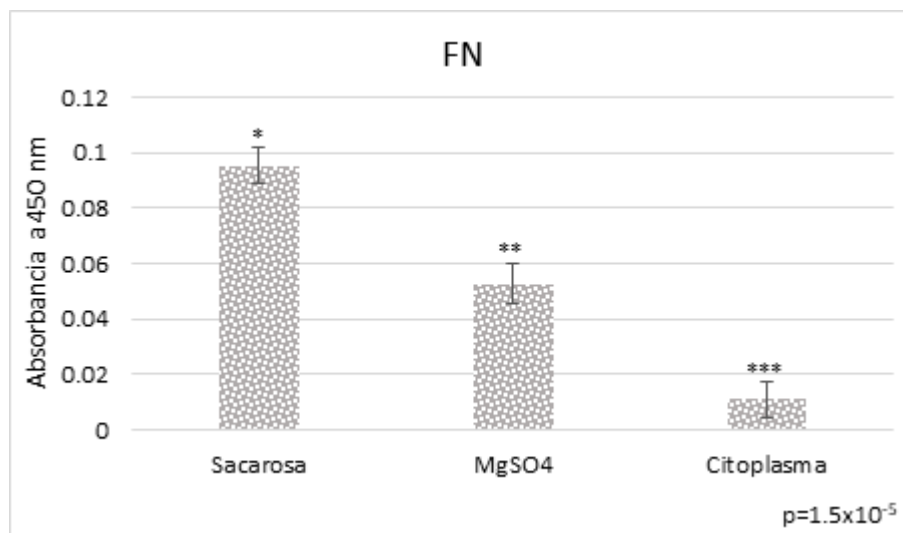
Después de la expresión a pequeña escala y la extracción de las proteínas mediante los protocolos de extracción periplásmica y citoplásmica, se procedió a realizar un ELISA de expresión con los extractos obtenidos. Los valores de absorbancia obtenidos del lector EPOCH se analizaron mediante ANOVA de una vía con un intervalo de confianza del 95%, obteniendo una diferencia significativa menor a 0.05, por lo que se procedió a realizar la prueba *post hoc* de Tukey. Los resultados de la expresión de F\_T16 y FN mostraron la recuperación de proteína en las tres fracciones evaluadas, aunque en menor cantidad para la última extracción que corresponde a la fracción obtenida con el protocolo de extracción citoplásmica. No se observó diferencia significativa entre la recuperación de proteína F\_T16 de las fracciones Sacarosa y

MgSO<sub>4</sub>, mientras que para FN no se observó similitud entre ninguna de las fracciones (figuras 24 y 25). Estos resultados confirman la obtención de las proteínas recombinantes FN y F\_T16.

Con este protocolo de extracción se buscaba recuperar la mayor cantidad posible de proteína. Aunque no se esperaba encontrar proteína en las fracciones periplásmicas, se infiere que las células se lisaron desde el primer paso al descongelarlas.



**Figura 24.** ELISA de expresión de F\_T16. Absorbancias obtenidas del ELISA de expresión de las fracciones de la extracción de F\_T16. ANOVA de una vía \*\* p=0.04.



**Figura 25.** ELISA de expresión de FN. Absorbancias obtenidas del ELISA de expresión de las fracciones de la extracción de FN. ANOVA de una vía \*p<0.05.

### 3.4 Verificación de plásmido pComb3X-TN16

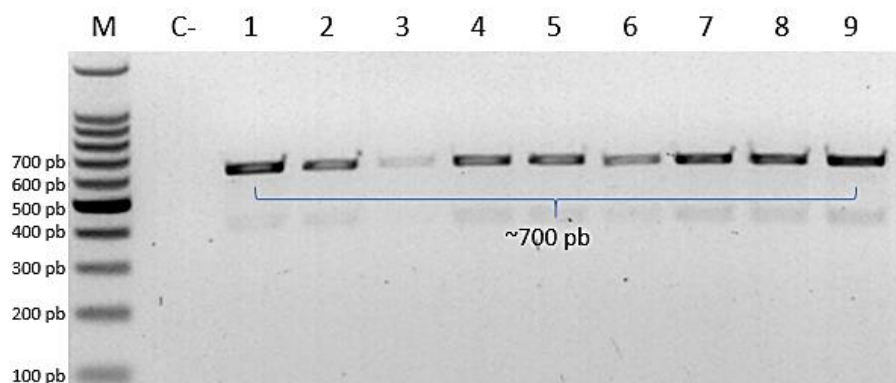
El VNAR TN16 se utilizó como control positivo en los ensayos de reconocimiento por TNF $\alpha$ , fue necesario resuspender un stock liofilizado que contenía el plásmido pComb3x-TN16 y corroborar que correspondiera con la secuencia reportada para TN16. Para esto, se resuspendió el plásmido, se cuantificó por espectrofotometría y se utilizó para transformar células BL21. Se realizó PCR de colonia buscando un fragmento de ~700 pb, y se secuenciaron los productos que dieron positivo a ese fragmento.

El plásmido resuspendido tuvo una pureza de 1.95 (tabla 9) y todas las colonias aisladas dieron positivo al fragmento de interés (figura 26). Al comparar los resultados de la secuenciación contra la secuencia reportada para TN16, la clona 1 coincidió al 100%, en la imagen 27 se observa el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de pComb3x-TN16 y TN16 con 145 aminoácidos incluyendo a las etiquetas 6xHis y HA en el extremo carboxilo terminal.

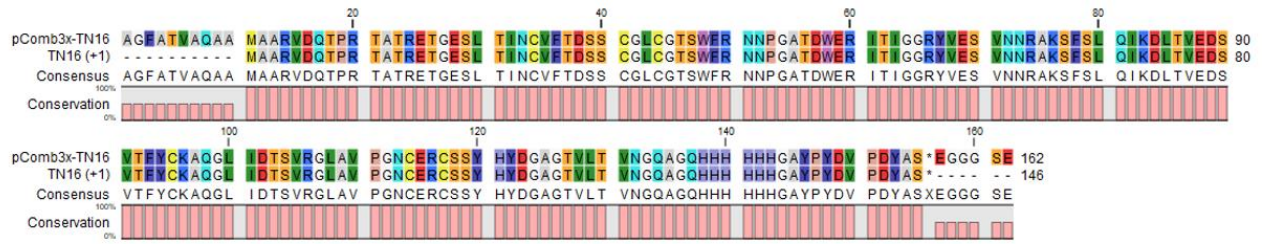
Con estos resultados se confirmó la identidad del plásmido pComb3x-TN16 y se procedió a expresar la proteína TN16 a gran escala.

**Tabla 9.** Resultados espectrofotométricos de pComb3x-TN16.

	260/280	Abs 260	[ng/ $\mu$ L]	VOLUMEN
pComb3x-TN16	1.95	8.71	435.5	20 $\mu$ l



**Figura 26.** PCR de colonia pComb3x-TN16. M: Marcador molecular 100 pb (Promega) C-: control negativo de PCR, carriles 1-9: PCR de colonias aisladas de BL21 transformadas con el plásmido pComb3x-TN16.



**Figura 27.** Análisis de secuencia pComb3x-TN16. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de pComb3x-TN16 con la secuencia de aminoácidos reportada para TN16.

### 3.5 Resultados de la purificación de proteínas

Se expresaron a gran escala las proteínas TN16, FN y F\_T16, se extrajeron por ultrasonificación, se purificaron y finalmente se dializaron. Su purificación se evaluó mediante tinción Coomassie de geles de poliacrilamida y Western blot.

El primer lote de TN16 fue purificado por IMAC previo a su purificación por inmunoafinidad, en la figura 28A se evaluaron las fracciones que presentaron mayor señal en el cromatograma del FPLC, se observó una gran cantidad de proteínas inespecíficas en todas las fracciones evaluadas. Las fracciones 13,14,15 y 16 presentaron una banda marcada de ~15.85 kDa, que es el tamaño esperado para TN16, se corroboró la identidad del VNAR en esas fracciones mediante Western blot (figura 28B). Posteriormente, esas fracciones fueron purificadas por cromatografía de inmunoafinidad, eliminando algunas proteínas no específicas (figura 29A). Mediante Western blot, se confirmó la presencia de una banda muy tenue de TN16 en la Elución (E) (figura 29B). Estos resultados indican una purificación parcial del primer lote de TN16, así como una pérdida evidente del material debido a la doble purificación.

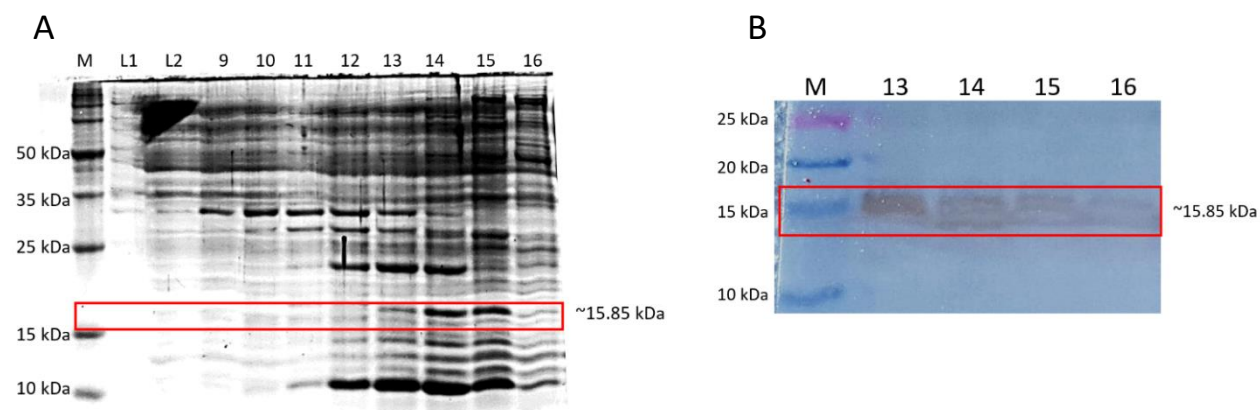
Con el objetivo de ajustar las condiciones de purificación por IMAC, se obtuvo un segundo lote de TN16, pero al observar la pérdida de proteína con la doble purificación y debido al acortamiento del periodo experimental; el segundo lote de TN16 fue purificado por cromatografía de inmunoafinidad, sin previa IMAC. Se obtuvieron algunas proteínas inespecíficas en la Elución (figura 30A), y se confirmó que la banda de ~15.85 kDa corresponde a TN16 (figura 30B), se observa también una banda de ~18 kDa que puede ser relacionada con TN16+peIB. Estos resultados indican una purificación parcial de TN16.



Para F\_T16 y FN se evaluaron las fracciones de: Medio de cultivo (M), que se almacenó después de la expresión a gran escala; extracto inicial (I); extracto después de haberse pasado por la columna dos veces (FT); los tres lavados y la Elución dializada (E).

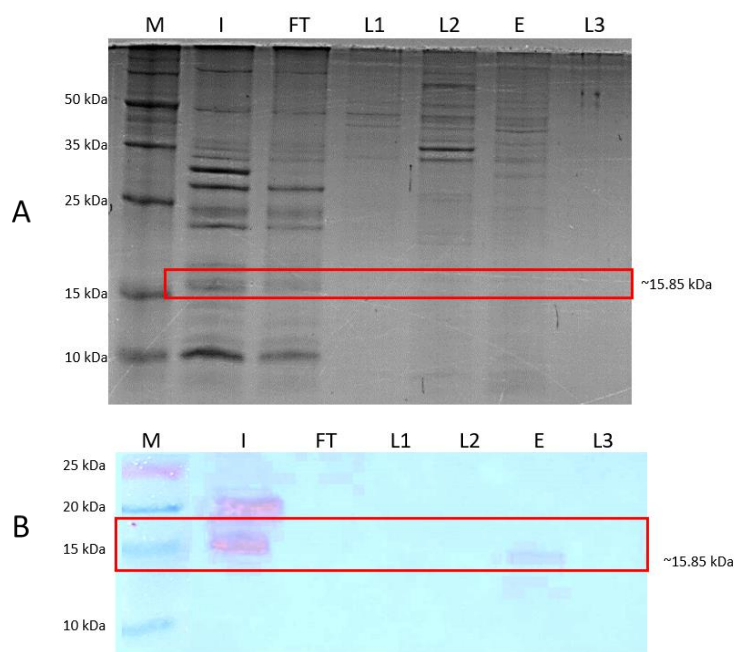
Para F\_T16 se encontró una proteína de  $\sim 15$  kDa, que es el tamaño esperado, en la mayoría de las fracciones excepto en el medio de cultivo (M) y en el lavado tres (L3), como era de esperarse debido a la expresión citoplásmica y una correcta elución. La presencia de la proteína en los lavados 1 y 2 puede estar relacionada con un exceso de proteína en la columna, mientras que su presencia en la fracción FT se relaciona con una alta cantidad de F\_T16 en el extracto. Estos resultados indican una purificación parcial de F\_T16 (figura 31).

El tamaño esperado de FN es de  $\sim 14$  kDa, y se encontró tanto en la fracción inicial como en la Elución, a pesar de que no se observa nítidamente en la tinción con Coomassie (figura 32A), el Western blot permitió identificar a FN en esas fracciones, las marcas indefinidas en la membrana de nitrocelulosa se atribuyen a una sobreexposición al revelador (figura 32B). Se obtuvo la proteína FN parcialmente purificada, y se observó la presencia de varias proteínas inespecíficas de entre 15 y 25 kDa.

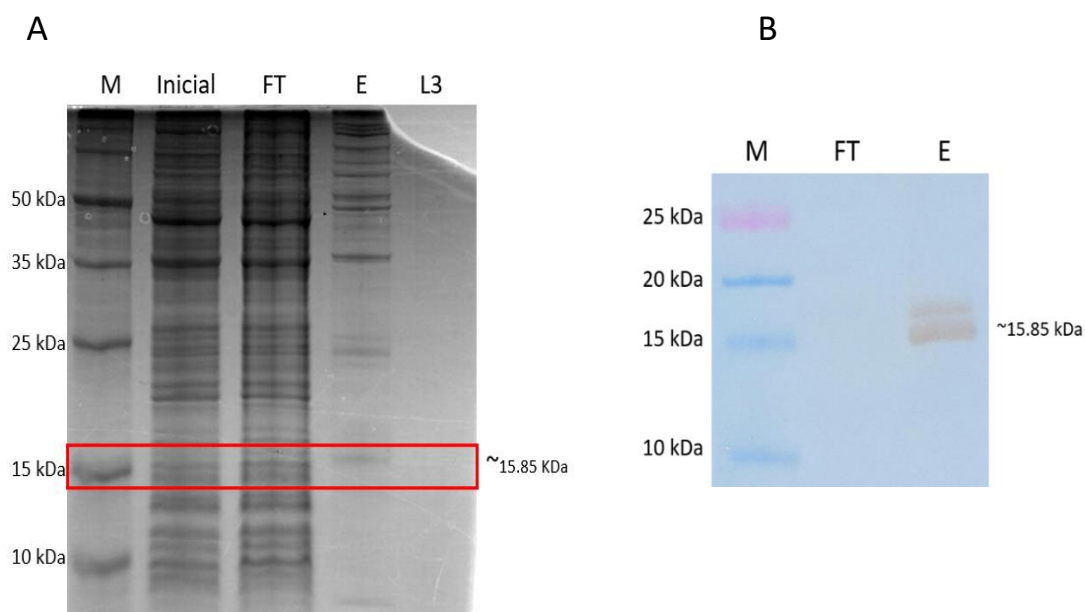


**Figura 28.** Evaluación de la purificación por IMAC de TN16. A) Tricine-SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie M: marcador de peso molecular de proteínas (PROMEGA) L1 y L2: lavados 1 y 2. B) Western blot M: marcador Dual xtra (Bio-Rad Laboratories).

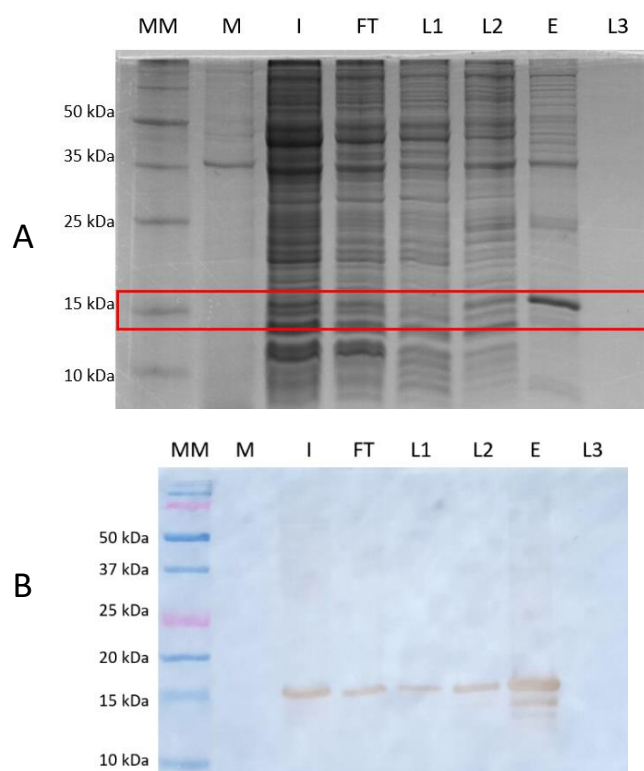




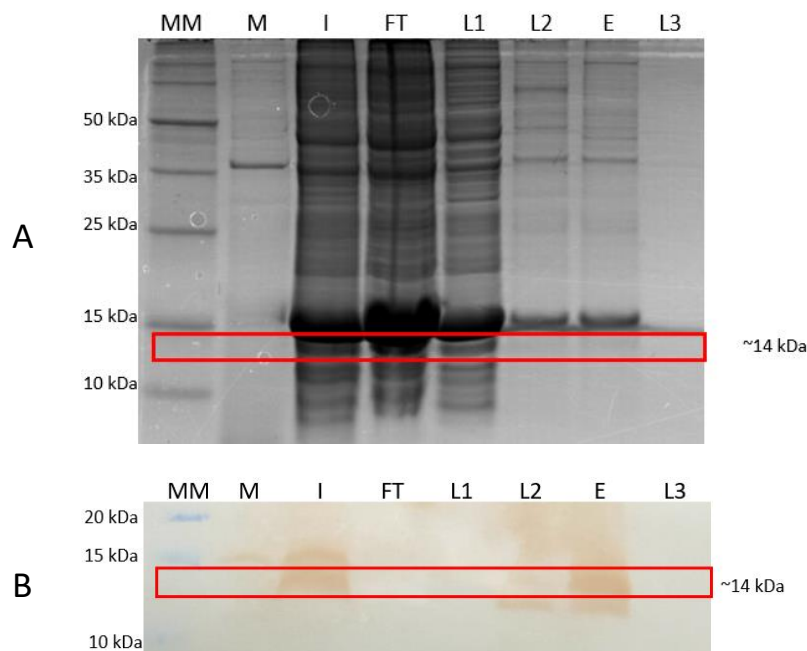
**Figura 29.** Evaluación de la purificación de TN16 por inmunoafinidad con previa IMAC. A) Tricina-SDS-PAGE teñido con azul de Coomasie M: marcador de peso molecular de proteínas (PROMEGA), B) Western blot M: marcador Dual xtra (Bio-Rad Laboratories). I: extracto inicial, FT: del inglés flow through, L1, L2 y L3: lavados 1, 2 y 3, E: Elución dializada.



**Figura 30.** Evaluación de la purificación por inmunoafinidad sin previa IMAC de TN16. A) Tricina-SDS-PAGE teñido con azul de Coomasie M: marcador de peso molecular de proteínas (PROMEGA), B) Western blot M: marcador Dual xtra (Bio-Rad Laboratories). I: extracto inicial, FT: del inglés flow through, E: Elución dializada, L3: lavado 3.



**Figura 31.** Evaluación de la purificación de F\_T16. A) Tricina-SDS-PAGE teñido con azul de Coomasie MM: marcador de peso molecular de proteínas (PROMEGA), B) Western blot MM: marcador Dual xtra (Bio-Rad Laboratories). M: Medio de cultivo, I: extracto inicial, FT: del inglés flow through, L1, L2 y L3: lavados 1, 2 y 3, E: Elución dializada.

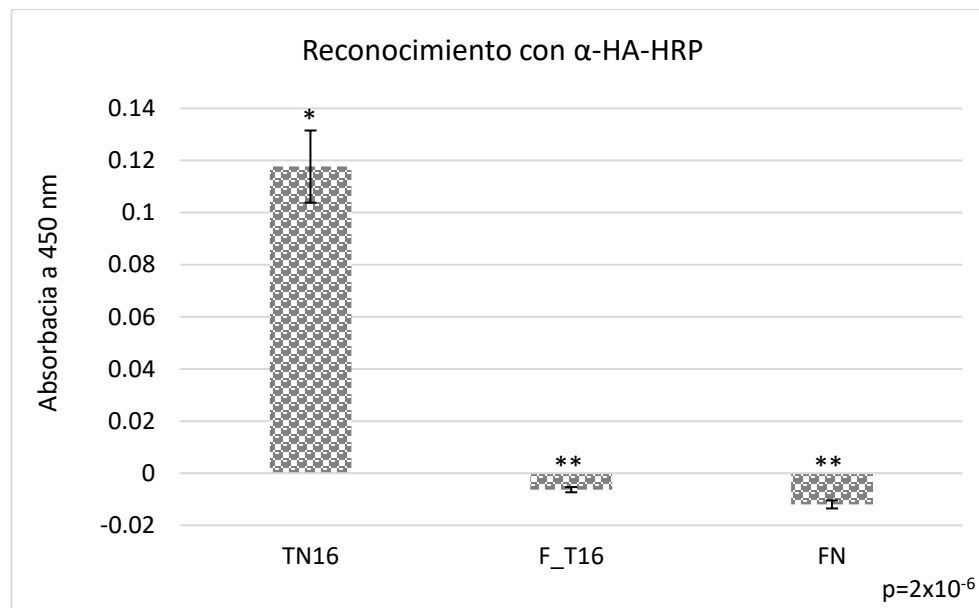


**Figura 32.** Evaluación de la purificación de FN. A) Tricina-SDS-PAGE teñido con azul de Coomasie MM: marcador de peso molecular de proteínas (PROMEGA), B) Western blot MM: marcador Dual xtra (Bio-Rad Laboratories). M: Medio de cultivo, I: extracto inicial, FT: del inglés flow through, L1, L2 y L3: lavados 1, 2 y 3, E: Elución dializada

### 3.6 Evaluación del reconocimiento de TNF $\alpha$ por F\_T16

#### 3.6.1 ELISA con anticuerpo anti-HA

Para evaluar el reconocimiento de F\_T16 por TNF $\alpha$ , se efectuó el ELISA de reconocimiento utilizando un anticuerpo primario con afinidad por la etiqueta HA, se usó a TN16 como control positivo de reconocimiento y a FN como control negativo, empleando las proteínas parcialmente purificadas. Los valores de absorbancia obtenidos en el ensayo, fueron analizados mediante ANOVA de una vía, que mostró un valor de p menor a 0.05 y por lo tanto se realizó la prueba de Tukey, que señaló similitud entre F\_T16 y el control negativo (FN) con valores cercanos a cero, lo cual podría interpretarse como falta de reconocimiento de ambas proteínas. Solo TN16 (control positivo) mostró reconocimiento por TNF $\alpha$  (figura 30). Este resultado no coincidió con el ensayo *in silico* donde F\_T16 reconoció a TNF $\alpha$ , y tuvo mejor reconocimiento que TN16.



**Figura 33.** ELISA de reconocimiento con anticuerpo anti-HA. Absorbancias obtenidas del ELISA de reconocimiento de las proteínas purificadas TN16, F\_T16 y FN. ANOVA de una vía \*  $p < 0.05$ . TN16: control positivo, FN: control negativo.

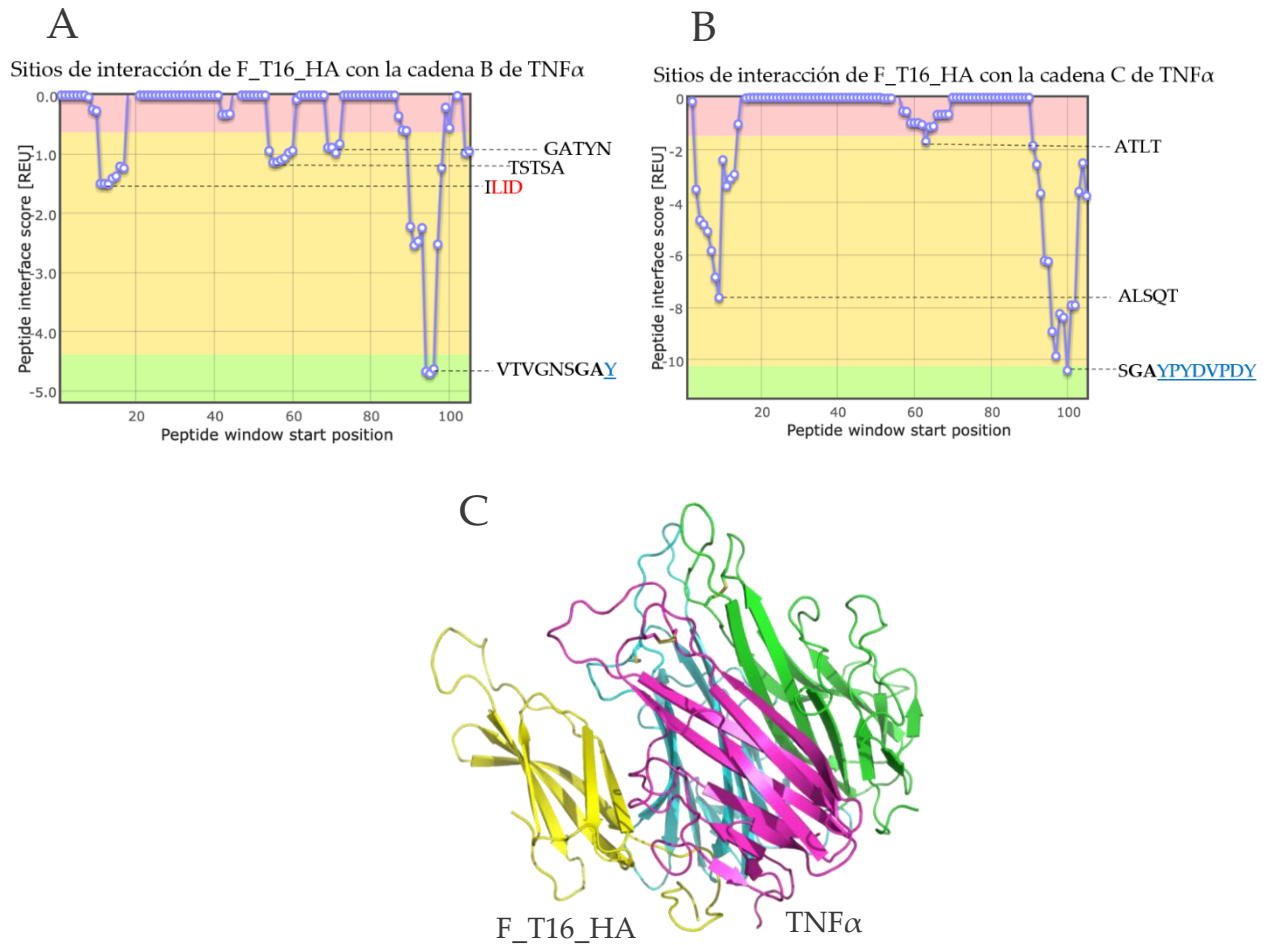
### 3.6.2 Resultados de ensayo *in silico*

Debido a los resultados obtenidos en el ELISA, se solicitó un nuevo ensayo *in silico* que consistió en; un análisis de interacción proteína-proteína con TNF $\alpha$ , en el que se utilizó el modelo nombrado F\_T16\_HA que incluyó a las etiquetas HA y 6xHis en la secuencia de la quimera.

En este nuevo ensayo, se observó una fuerte interacción de la quimera con la cadena C de TNF $\alpha$  a través de los aminoácidos **SGAYPYDVPDY**, con la cadena B la interacción está dada por **VTVGNSGAY**, los aminoácidos en azul corresponden a la etiqueta HA, los resaltados en negritas forman el linker entre la secuencia del andamio y la etiqueta, el resto son parte de la secuencia del andamio (figura 34). Esto discrepa con el análisis de interacción que empleó el modelo inicial de F\_T16, que no contiene etiquetas, donde se reportó el reconocimiento de TNF $\alpha$  mediante los aminoácidos del CDR3 (figura 8). Estos resultados señalan que F\_T16 tiene reconocimiento por TNF $\alpha$ , aunque no de la manera que se esperaba.

Además, el puntaje reportado para la interacción de F\_T16\_HA con TNF $\alpha$  fue de -41.79 REU, lo que supera los puntajes de F\_T16, TN16 e incluso el puntaje de interacción de TNF $\alpha$  con su receptor natural TNFR2 (tabla 10). Esto indica que las etiquetas HA y 6xHis afectan favorablemente la capacidad de reconocimiento de la quimera por su antígeno.

En la tabla 10, además de la comparación entre los puntajes de interacción, también destaca la coincidencia entre los sitios de unión de TNF $\alpha$  en interacción con TNFR2, y los sitios de unión de TNF $\alpha$  cuando interacciona con TN16 o F\_T16, lo que pudiera indicar capacidad de neutralización. Sin embargo, queda un vacío analítico en la interacción de TNF $\alpha$  con F\_T16\_HA que deberá ser cubierto en futuros estudios.



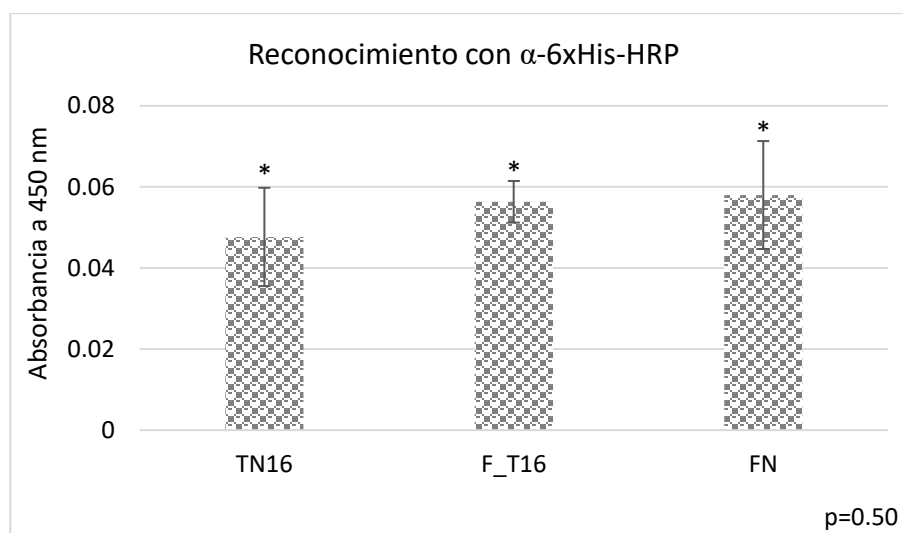
**Figura 34.** Interacción proteína-proteína TNF $\alpha$ /F\_T16\_HA. En el gráfico A se muestran las interacciones entre F\_T16\_HA y la cadena B de TNF $\alpha$ , en el gráfico B las que interaccionan con la cadena C de la citocina. Los aminoácidos en rojo corresponden al CDR3, los azules a la etiqueta HA y los resaltados en negritas componen el linker entre la F\_T16 y la etiqueta. La figura C corresponde al modelo del complejo TNF $\alpha$ /F\_T16 en el que se muestran las cadenas A, B y C de TNF $\alpha$  en color verde, cian y rosa respectivamente, y F\_T16\_HA coloreado en amarillo. Fuente: M.C. Salvador Dueñas Espinoza, usando ClusPro y Peptiderive.

**Tabla 10.** Sitios de interacción con TNF $\alpha$ . En color rojo se marcan los aminoácidos que pertenecen al CDR3 y en verde los de otras regiones hipervariables, los aminoácidos en azul corresponden a la etiqueta HA y los aminoácidos en negritas son los aminoácidos de TNF $\alpha$  que interaccionan con su receptor

Molécula	Interacción con cadena A de TNF $\alpha$	Cadena A TNF $\alpha$	Interacción con cadena B TNF $\alpha$	Cadena B TNF $\alpha$	REU
TNR-2	VPECLSCGSR LSKQEGCRL	ANPQAEG <b>LNRRANALLA</b> ANPWY <b>DFAESGQV</b>	YCALSKE	<b>IAVSYQTVN</b> <b>VLLT</b>	-39.78
TN16	<b>RGLAVPGNCE</b>  <b>NPGATDW</b>	IAVSQTKVN GGFQLE  CPSTHVLLT	<b>NNPGATDWER</b>  <b>LIDTSVRGLAVPGN</b>	EAKPWYEPIY <b>LFAESGQV</b> RTPSDKP <b>RRANALLA</b> LFKGQG	-33.01
F_T16	<b>IDTSVRGLAV</b> LKDQQR	GGVFQLEKGD <b>RIAVSYQTKV</b>	QFRVPGTS  <b>TSVRGLAVPG</b>	RTPSDKPV <b>NRRANALLAN</b> <b>AESGQVY</b>	-38.21
F_T16_HA	<b>ILID</b> TSTSA GATYN VTVGNSGAY		ALSQT ATLT <b>SGAYPYDVPDY</b>		-41.79

### 3.6.3 ELISA con anticuerpo anti-6xHis

Para comprobar los resultados del ensayo *in silico* antes mencionado, se realizó un ELISA de reconocimiento, utilizando un anticuerpo primario con afinidad por la etiqueta 6xHis y no por HA. El análisis de los valores de absorbancia de este ensayo arrojó un valor de p mayor a 0.05, por lo que no se realizó ninguna prueba a *posteriori*. En la gráfica se observa la similitud estadística de la capacidad de reconocimiento por TNF $\alpha$ , del control positivo de reconocimiento (TN16) y de las proteínas F\_T16 y FN (figura 32). Recordando que FN tiene las etiquetas HA y 6xHis en la misma posición que la quimera, estos resultados coinciden con lo encontrado en el análisis *in silico*. De esta manera comprobamos que la proteína recombinante F\_T16 tiene reconocimiento por TNF $\alpha$ .



**Figura 35.** ELISA de reconocimiento con anticuerpo anti-6xHis. Absorbancias obtenidas del ELISA de reconocimiento de las proteínas purificadas TN16, F\_T16 y FN. ANOVA de una vía \*  $p=0.05$ . TN16: control positivo.

### 3.7 Comprobación de la capacidad de la proteína quimérica para neutralizar a $\text{TNF}\alpha$

La comprobación de la capacidad de la proteína quimérica para neutralizar a  $\text{TNF}\alpha$  no pudo ser realizada, debido a la extensión que alcanzó la comprobación del reconocimiento de la proteína por  $\text{TNF}\alpha$ , y a que los tiempos de experimentación se vieron reducidos por efecto de la pandemia en curso.

Futuros estudios deberán profundizar nuestros resultados, para conocer si las regiones de  $\text{TNF}\alpha$  a las que se une la etiqueta HA son las mismas a las que se une su receptor y, si lo anterior fuera positivo, corroborar la neutralización mediante un ensayo *in vivo* en células L929.

Tabla 11. Resultados esperados vs resultados obtenidos.

OBJETIVO	META	PASO	RESULTADO ESPERADO	RESULTADO OBTENIDO
1. OBTENER LA PROTEÍNA RECOMBINANTE F_T16	Construcción de plásmido recombinante.	Diseño de genes FN y F_T16	-Genes sintéticos para expresión en <i>E. coli</i>	pUCIDT-AMP-FN pUCIDT-AMP-F_T16
		Preparación de insertos	-Stock de genes sintéticos - Insertos FN y F_T16	1.95 µg de FN 1.53 µg de F_T16 listos para clonarse en pET28a
		Digestión de pET28a	Vector listo para ligación con insertos.	1.33 µg de pET28a listo para ligación
		Ligación	Plásmidos recombinantes para expresar FN y F_T16	pET28a-FN pET28a-F_T16
	Expresión de proteínas FN y F_T16	Sistema de expresión	pET28a-FN, pET28a-F_T16 en células SHuffle	Shuffle-pET28a-FN Shuffle-pET28a-F_T16
		Expresión a pequeña escala	Obtener las proteínas FN y F_T16	Proteínas recombinantes FN y F_T16.
2. DETERMINAR LA CAPACIDAD DE RECONOCIMIENTO DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA POR TNFα	Obtener TN16, F_T16 y FN para ensayos <i>in vitro</i>	Sistema de expresión TN16	pComb3x-TN16 en BL21	BL21-pComb3x-TN16
		Expresión a gran escala	TN16, F_T16 y FN	Proteínas recombinantes TN16, F_T16 y FN
		Purificación de proteínas	Proteínas TN16, F_T16 y FN <b>puras</b>	TN16, F_T16 y FN <b>parcialmente purificadas.</b>
	Ensayos de reconocimiento	ELISA con anticuerpo anti-HA	<b>Reconocimiento por TNFα de F_T16.</b>	<b>No se observó reconocimiento</b>
		Ensayo <i>in silico</i> adicional	<b>Falta de reconocimiento de F_T16 debido a las etiquetas HA y 6xHis</b>	<b>Hubo reconocimiento de F_T16 por TNFα mayor a TNFR2</b>
		ELISA con anticuerpo anti-6xHis	Reconocimiento de F_T16 por TNFα	Reconocimiento por TNFα de F_T16 y FN
3. COMPROBAR LA CAPACIDAD DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA PARA NEUTRALIZAR TNFα	Ensayos <i>in vivo</i> para evaluar la capacidad	NO SE REALIZÓ NINGÚN ENSAYO	NO SE REALIZÓ NINGÚN ENSAYO	NO SE REALIZÓ NINGÚN ENSAYO

Resultados en negritas se muestran los resultados que discreparon entre los resultados esperados y los obtenidos.



## Capítulo 4. Discusión

---

Las predicciones *in silico* que se obtuvieron para la proteína quimérica F\_T16, fueron la base para la realización de este proyecto. El haber agregado la etiqueta HA durante la construcción de los genes sintéticos, y la etiqueta 6xHis durante la expresión; fue muy importante para lograr la purificación e identificación del andamio y la quimera, en el corto tiempo disponible para el periodo de experimentación, y para capitalizar los inesperados resultados de los ensayos de reconocimiento.

En relación con el Objetivo 1, uno de los logros de esta tesis es el robustecimiento del protocolo de ligación; el operar la indicación temprana de Sambrook y colaboradores (1989) fue paso clave para lograr la clonación, y el haber incubado los cultivos líquidos nos permitió proseguir hacia la comprobación de la clonación.

En este punto es necesario comentar respecto a la extracción de las proteínas; el hecho de que se haya recuperado proteína durante la extracción periplásmica, siendo que la expresión se dio en el citoplasma, nos lleva a pensar que las células congeladas antes de la extracción, se lisaron al descongelarse. Si bien se recupero proteína en todas las fracciones de la extracción, el objetivo de recuperar la mayor cantidad posible de proteína, pudo haberse logrado también con un protocolo que involucrara menos pasos y menos reactivos. Es por esto que para la extracción de la expresión a gran escala, se empleó el método de lisis mecánica por ultrasonicación, que permite la extracción de una gran cantidad de proteína en un volumen pequeño de solución, lo que resulta favorable en las etapas de purificación.

En relación con el Objetivo 2, un primer acierto fue no haber dado por perdida la proteína F\_T16, luego de que el primer ensayo no mostrara coincidencia con los análisis *in silico*. Así como también fue acertado el solicitar un nuevo ensayo de interacción, usando un modelo de F\_T16 que incluyera las etiquetas HA y 6xHis, ya que esto no solo evidenció la capacidad de reconocimiento que posee F\_T16, sino que aportó resultados interesantes que abren un panorama en el uso de la etiqueta HA, que antes no había sido imaginado, y podrá ser objeto de estudio en futuros ensayos.

Otro acierto fue la ejecución del ELISA de reconocimiento empleando un anticuerpo anti-Histidinas, ya que la interacción de la etiqueta HA con TNF $\alpha$  no permite reconocimiento por el anticuerpo anti-HA.

La no coincidencia del ensayo *in vitro* con el modelo *in silico* fue inesperada, debido a que todos los antecedentes mostraron coincidencia (Bojalil *et al.*, 2013; Camacho-Villegas *et al.*, 2013; Millán-Gómez *et*

*al.*, 2018; Cabanillas-Bernal *et al.*, 2019). Sin embargo, esto no significa que haya que eliminar el modelo inicial de F\_T16, más bien deberá evaluarse *in vitro* mediante la expresión de F\_T16 sin etiquetas.

Con respecto al objetivo 3, es pertinente recordar que; la comprobación de la capacidad de la proteína quimérica para neutralizar a TNF $\alpha$ , no pudo ser realizada debido a la extensión que alcanzó la comprobación del reconocimiento de la proteína por TNF $\alpha$ , y a que los tiempos de experimentación se vieron reducidos por efecto de la pandemia en curso. Sin embargo, debido a los resultados obtenidos en esta tesis, es posible proyectar nítidamente el curso de futuros estudios que deberán profundizar dichos resultados; investigando si las regiones de TNF $\alpha$  a las que se une la etiqueta HA son las mismas a las que se une su receptor, y si lo anterior fuera positivo, corroborar la neutralización mediante un ensayo *in vivo* en células L929.

## Capítulo 5. Conclusiones

---

En relación con el Objetivo 1:

La recomendación de realizar un paso previo a la ligación robustece el protocolo de clonación, y amerita ser incorporada formalmente a los protocolos de análisis.

En relación con el objetivo 2:

- 1) La no coincidencia del ensayo *in vitro* con los análisis *in silico* es un evento que se reporta por primera vez en el equipo de trabajo en el que se inserta esta tesis. Sin embargo, se sugiere que sin eliminar el modelo inicial de F\_T16 se compruebe su capacidad de reconocimiento y neutralización cuidando que la secuencia de la proteína sea lo más parecido a lo que se evaluó *in silico*.
- 2) La proteína quimérica F\_T16, obtenida en este trabajo, tiene capacidad de reconocimiento por TNF $\alpha$ .

En relación con el Objetivo 3:

La interacción de la proteína quimérica deberá ser estudiada a profundidad y evaluar si tiene la capacidad de neutralizar a TNF $\alpha$ .

Finalmente, futuros estudios deberán profundizar los resultados de esta tesis mediante un ensayo *in silico* para conocer si las regiones de TNF $\alpha$  a las que se une la etiqueta HA son las mismas a las que se une su receptor. Si lo anterior fuera positivo, se deberá corroborar la neutralización mediante un ensayo *in vivo* en células L929 y, si fuera negativo, deberá obtenerse la proteína F\_T16 sin etiquetas y realizar ensayos *in vitro* para comprobar reconocimiento, así como ensayos *in vivo* para comprobar neutralización.

## Literatura citada

---

- Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S. 2018. *Inmunología celular y molecular* (9th ed). Elsevier.
- Barelle, C., Porter, A. 2015. VNARs: An Ancient and Unique Repertoire of Molecules That Deliver Small, Soluble, Stable and High Affinity Binders of Proteins. *Antibodies*, 4(3), 240–258. doi:10.3390/antib4030240
- Bloom, L., Calabro, V. 2009. FN3: a new protein scaffold reaches the clinic. *Drug Discovery Today*, 14(19–20), 949–955. doi:10.1016/j.drudis.2009.06.007
- Bojalil, R., Mata-González, M. T., Sánchez-Muñoz, F., Yee, Y., Argueta, I., Bolaños, L., Amezcua-Guerra, L. M., Camacho-Villegas, T. A., Sánchez-Castrejón, E., García-Ubbelohde, W. J., Licea-Navarro, A. F., Márquez-Velasco, R., Paniagua-Solís, J. F. 2013. Anti-tumor necrosis factor V NAR single domains reduce lethality and regulate underlying inflammatory response in a murine model of endotoxic shock. *BMC Immunology*, 14(1). doi:10.1186/1471-2172-14-17
- Brizzard, B. 2008, April 16. Epitope tagging. *BioTechniques*, Vol. 44. doi:10.2144/000112841
- Cabanillas-Bernal, O., Dueñas, S., Ayala-Avila, M., Rucavado, A., Escalante, T., Licea-Navarro, A. F., Id, A. F. L. 2019. Synthetic libraries of shark vNAR domains with different cysteine numbers within the CDR3. *PLoS ONE*, 14(6), 1–24. doi:10.1371/journal.pone.0213394
- Camacho-Villegas, T., Mata-Gonzalez, T., Sanchez, E., Licea, A., Paniagua-Solis, J., Sanchez, E., Licea, A. 2013. Human TNF cytokine neutralization with a vNAR from *Heterodontus francisci* shark. *MAbs*, 5(1), 80–85. doi:10.4161/mabs.22593
- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L., Righetti, P. G. 2004. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 25(9), 1327–1333. doi:10.1002/elps.200305844
- Comeau, S. R., Gatchell, D. W., Vajda, S., Camacho, C. J. 2004. ClusPro: a fully automated algorithm for protein-protein docking. *Nucleic Acids Research*, 32, 96–99.
- Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M. A., Madhusudhan, M. S., Eramian, D., Shen, M., Pieper, U., Sali, A. 2007. Comparative protein structure modeling using MODELLER. In *Current Protocols in Protein Science*. Editorial board, John E Coligan.
- Field, J., Nikawa, J., Broek, D., MAcDONALD, B., Linda Rodgers, It, Wilson, I. A., Lerner, R. A., WIGLERI, M. 1988. Purification of a RAS-Responsive Adenylyl Cyclase Complex from *Saccharomyces cerevisiae* by Use of an Epitope Addition Method Downloaded from. In *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* (Vol. 8). from <http://mcb.asm.org/>
- Harlow, E., Lane, D. 1988. *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, NY, USA.
- Jank, L., Pinto-Espinoza, C., Duan, Y., Koch-Nolte, F., Magnus, T., Rissiek, B. 2019. Current Approaches and Future Perspectives for Nanobodies in Stroke Diagnostic and Therapy. *Antibodies*, 8(1), 5. doi:10.3390/antib8010005
- Jarvik, J. W., Telmer, C. A. 1998. EPITOPE TAGGING. In *Annu. Rev. Genet* (Vol. 32). from [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org)

- Kalden, J. R., Schulze-Koops, H. 2017, November 21. Immunogenicity and loss of response to TNF inhibitors: Implications for rheumatoid arthritis treatment. *Nature Reviews Rheumatology*, Vol. 13. doi:10.1038/nrrheum.2017.187
- Koide, A., Bailey, C. W., Huang, X., Koide, S. 1998. The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins. *Journal of Molecular Biology*, 284(4), 1141–1151. doi:10.1006/jmbi.1998.2238
- Li, Y. 2010. Commonly used tag combinations for tandem affinity purification. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 55(2), 73–83. doi:10.1042/BA20090273
- Lipovšek, D. 2011. Adnectins: engineered target-binding protein therapeutics. *Protein Engineering, Design and Selection*, 24(1–2), 3–9. doi:10.1093/protein/gzq097
- London, N., Raveh, B., Movshovitz-Attias, D., Schueler-Furman, O. 2010. Can self-inhibitory peptides be derived from the interfaces of globular protein-protein interactions? *Proteins*, 78, 3140–3149.
- Lucena, S., Arocha, C. L., Guerrero, B. 2006. Fibronectina . Estructura y funciones asociadas a la hemostasia. 48(2), 249–262.
- Lyskov, S., Chou, F. C., Conchúir, S. Ó., Der, B. S., Drew, K., Kuroda, D., Xu, J., Weitzner, B. D., Renfrew, P. D., Sripakdeevong, P., Borgo, B., Havranek, J. J., Kuhlman, B., Kortemme, T., Bonneau, R., Gray, J. J., Das, R. 2013. Serverification of Molecular Modeling Applications: The Rosetta Online Server That Includes Everyone (ROSIE). *PLoS One*, 8, 1–11.
- Main, A. L., Harvey, T. S., Baron, M., Boyd, J., Campbell, I. D. 1992. The three-dimensional structure of the tenth type III module of fibronectin: An insight into RGD-mediated interactions. *Cell*, 71(4), 671–678. doi:10.1016/0092-8674(92)90600-H
- Márquez-Velasco, R., Bojalil, R., Buelna, A., Flores-Guzmán, F., Estevez-Ramirez, J., Laguna, J., Hernández, A. M., Díaz-Quiñonez, A., Paniagua-Solís, J. F. 2006. Anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  F(ab')<sub>2</sub> antibody fragments protect in murine polymicrobial sepsis: Concentration and early intervention are fundamental to the outcome. *Inflammation Research*, 55(9), 378–384. doi:10.1007/s00011-006-6001-6
- Matz, H., Dooley, H. 2019. Shark IgNAR-derived binding domains as potential diagnostic and therapeutic agents. *Developmental and Comparative Immunology*, 90(June 2018), 100–107. doi:10.1016/j.dci.2018.09.007
- Millán-Gómez, D., Dueñas, S., Muñoz, P. L. A., Villegas, T. C., Elosua, C., Cabanillas-Bernal, O., Escalante, T., Perona, A., Abia, D., Drescher, F., Fournier, P. G. J. J., Ramos, M. A., Mares, R. E., Paniagua-Solis, J., Mata-Gonzalez, T., Gonzalez-Canudas, J., Hoffman, R. M., Licea-Navarro, A., ... Sánchez-Campos, N. 2018. *In silico*-designed mutations increase variable new-antigen receptor single-domain antibodies for VEGF165 neutralization. *Oncotarget*. doi:10.18632/oncotarget.25549
- Mitoma, H., Horiuchi, T., Tsukamoto, H., Ueda, N. 2018. Molecular mechanisms of action of anti-TNF- $\alpha$  agents – Comparison among therapeutic TNF- $\alpha$  antagonists. *Cytokine*, 101, 56–63. doi:10.1016/j.cyto.2016.08.014
- Monaco, C., Nanchahal, J., Taylor, P., Feldmann, M. 2015. Anti-TNF therapy: Past, present and future. *International Immunology*, 27(1), 55–62. doi:10.1093/intimm/dxu102
- Nelson, B., Sidhu, S. S. 2012. Synthetic antibody libraries. *Methods in Molecular Biology*, 899, 27–41. doi:10.1007/978-1-61779-921-1\_2

- Novagen. 1999. pET System Manual Novagen 1.
- Potts, J. R., Campbell, I. D. 1996. Structure and function of fibronectin modules. *Matrix Biology*, 15(5), 313–320. doi:10.1016/S0945-053X(96)90133-X
- Qiagen, F. S. 2003. The QIAexpressionist™ A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. from [www.qiagen.co.jp](http://www.qiagen.co.jp)[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)
- Roux, K. H., Greenberg, A. S., Greene, L., Strelets, L., Avila, D., Mckinney, E. C., Flajnik, M. F. 1998. Structural analysis of the nurse shark (new) antigen receptor (NAR): Molecular convergence of NAR and unusual mammalian immunoglobulins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(20), 11804–11809. doi:10.1073/pnas.95.20.11804
- Ruoslahti, E. 1988. Fibronectin and its receptors. *Annual Review of Biochemistry*, 57(9), 375–413. doi:10.1146/annurev.bi.57.070188.002111
- Schägger, H., von Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166(2), 368–379. doi:10.1016/0003-2697(87)90587-2
- Sedan, Y., Marcu, O., Lyskov, S., Schueler-Furman, O. 2016. Peptiderive server: derive peptide inhibitors from protein–protein interactions. *Nucleic Acids Research*, 44, 536–541.
- Shen, Y., Morishita, M., di Luccio, E. 2020. High yield recombinant expression and purification of oncogenic NSD1, NSD2, and NSD3 with human influenza hemagglutinin tag. *Protein Expression and Purification*, 166, 105506. doi:10.1016/j.pep.2019.105506
- Ubah, O. C., Steven, J., Porter, A. J., Barelle, C. J. 2019. An anti-hTNF- $\alpha$  variable new antigen receptor format demonstrates superior in vivo preclinical efficacy to Humira® in a transgenic mouse autoimmune polyarthritis disease model. *Frontiers in Immunology*, 10(MAR), 1–12. doi:10.3389/fimmu.2019.00526
- Valencia, R. F. 2002. Factor de necrosis tumoral: Actividad biológica en neumopatías intersticiales. *Revista Del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 15(1), 48–53.
- Wang, X., Zhang, B. 2013. customProDB: an R package to generate customized protein databases from RNA-Seq data for proteomics search. *Bioinformatics*, 29, 3235–3237.
- Xu, L., Aha, P., Gu, K., Kuimelis, R. G., Kurz, M., Lam, T., Lim, A. C., Liu, H., Lohse, P. A., Sun, L., Weng, S., Wagner, R. W., Lipovsek, D. 2002. Directed evolution of high-affinity antibody mimics using mRNA display. *Chemistry and Biology*, 9(8), 933–942. doi:10.1016/S1074-5521(02)00187-4