



Universidad Nacional de San Martín

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas “Dr. Rodolfo Ugalde”

"Desarrollo de una novedosa plataforma
cromatográfica basada en la proteína S-layer
de *lactobacillus* para la purificación de
proteínas"

Tesista: Lic. Emanuel J. Muruaga

Directores:

Dr. Gabriel Briones

Dra. Mara S. Roset

*Tesis para optar al grado de Doctor en Biología Molecular y Biotecnología
de la Universidad Nacional de San Martín*

Mayo 2023

ÍNDICE

ÍNDICE	2
AGRADECIMIENTOS.....	6
RESUMEN.....	8
PUBLICACIONES	10
INTRODUCCIÓN	11
PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	12
PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS A LO LARGO DE LA HISTORIA	14
SEPARACIÓN: CROMATOGRAFÍAS.....	17
<i>Cromatografías de afinidad.....</i>	<i>18</i>
<i>Cromatografía de afinidad mediante fusión a etiquetas proteicas.....</i>	<i>19</i>
<i>Remoción del Tag.....</i>	<i>23</i>
<i>Soportes en cromatografías de afinidad</i>	<i>25</i>
SISTEMAS DE EXPRESIÓN	26
PROTEÍNAS DE CAPA S	28
LACTOBACILLUS Y SLPA.....	30
<i>El dominio proteico dSlp-A.....</i>	<i>31</i>
ANTECEDENTES DEL LABORATORIO.....	32
OBJETIVOS	37

OBJETIVO GENERAL.....	38
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
1. <i>Desarrollo de los vectores de expresión:</i>	38
2. <i>Desarrollo de las matrices cromatográficas de afinidad:</i>	38
3. <i>Desarrollo de herramientas auxiliares para la generación de un kit completo de purificación de proteínas:</i>	39
RESULTADOS.....	41
CAPÍTULO I: BIO-MATRIX.....	42
<i>Puesta a punto de la matriz</i>	42
<i>Puesta a punto de la proteína modelo</i>	43
<i>Pegado</i>	46
<i>Elución</i>	48
<i>Estabilidad en el tiempo y reuso</i>	52
<i>Protocolo final</i>	53
<i>Escalado</i>	56
<i>Comparación con IMAC</i>	57
<i>Universalidad del sistema</i>	59
<i>Solubilidad</i>	63
<i>Conservación del correcto plegamiento proteico</i>	67
<i>Otras herramientas del sistema</i>	70

CAPÍTULO II: OTRAS MATRICES	75
<i>Bolitas de polipropileno</i>	75
<i>Esponjas de poliuretano</i>	77
<i>Impresos 3D de polihidroxibutirato-co-valerato (PHBV)</i>	79
<i>Miniesferas de Quitina y Quitosano</i>	82
<i>Bio-Matrix magnética</i>	85
CONCLUSIONES	89
DISCUSIÓN	92
PERSPECTIVAS FUTURAS	96
MATERIALES Y MÉTODOS	99
1. CEPAS Y PLÁSMIDOS.....	100
2. CONDICIONES DE CULTIVO	101
3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	101
4. CLONACIÓN	101
5. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS	103
6. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CON HIS _{TAG} : IMAC.....	103
7. PREPARACIÓN DE BIO-MATRIX	104
8. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CON SLAP _{TAG}	104
9. ESTABILIDAD DE LA BIO-MATRIX EN EL TIEMPO Y REUTILIZACIÓN	104
10. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	105

11.	MEDICIONES DE FLUORESCENCIA.....	105
12.	MODELADO DE PROTEÍNAS.....	105
13.	ISOTERMA DE ADSORCIÓN	106
14.	MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA CONFOCAL.....	106
15.	MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD PPIASA	106
16.	CLIVAJE DE SLAP _{TAG} CON PROTEASA HRV	107
17.	TINCIÓN CON CRISTAL VIOLETA.....	107
18.	SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE HIERRO.....	107
19.	GENERACIÓN DE BIO-MATRIX MAGNÉTICA	107
20.	GENERACIÓN DE ESPONJAS DE PUF	108
21.	IMPRESOS 3D DE POLI(HIDROXIBUTIRATO-CO-HIDROXIVALERATO).....	108
22.	BOLITAS DE POLIPROPILENO	108
23.	MATRICES DE QUITINA Y QUITOSANO	108
24.	GENERACIÓN DE ANTICUERPOS	108
25.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	109
	BIBLIOGRAFÍA	110

AGRADECIMIENTOS

Me siento honrado y agradecido por la oportunidad de presentar mi tesis doctoral en Biología Molecular y Biotecnología. Ha sido un largo, enriquecedor y difícil tiempo, pero sin el apoyo de muchas personas e instituciones, este logro no sería posible.

En primer lugar quiero agradecer a Dios, compañero y amigo. Quien nutre y plenifica mi vida dándome siempre horizontes más amplios y sentidos más profundos.

También, quiero expresar mi gratitud a mis directores de tesis, el Dr. Briones y la Dra. Roset. Gracias por darme la oportunidad de continuar trabajando en el laboratorio como becario doctoral cuando finalicé la tesina de licenciatura. Gracias Gaby por tu guía, paciencia y apoyo durante estos años. Tu dedicación y experiencia fueron fundamentales para mi formación. Gracias por la libertad para trabajar y elegir cómo formarme, siempre dirigiéndome desde el consejo y sugerencia. Gracias por el espacio brindado cuando empecé con la docencia, o cuando llegó la pandemia. Gracias por tu compromiso desinteresado con mi crecimiento, especialmente cuando la vida me lleva para otros puertos. Gracias Mara por siempre estar disponible. Sin tu apoyo, no habría sido posible completar mi tesis doctoral. Gracias a ambos por estar siempre disponibles para discutir ideas, responder preguntas y brindarme su conocimiento. Les estoy profundamente agradecido.

Además quiero agradecer a la UNSAM y al Instituto de Investigaciones Biológicas (IIB) por permitirme formarme profesionalmente y rodearme por excelentes científicos y personas. Gracias a la Comisión de doctorado y al personal de la administración por su predisposición y gestiones siempre rápidas.

Siempre voy a estar agradecido con mis compañeros del laboratorio, los que están ahora y los que pasaron por el grupo. Son amigos que me inspiran y motivan, lugar de catarsis y sostén durante estos años. Gracias por compartir alegrías y frustraciones.

También quiero agradecer a los técnicos, personal de mantenimiento y miembros de otros laboratorios por su contribución en la realización de experimentos, consejos y guía. Fue valioso contar con sus aportes.

No puedo olvidar a mi familia y amigos por su apoyo y motivación en todo momento. Gracias a su confianza y amor incondicional, pude enfrentar los desafíos y las dificultades así como celebrar los momentos de alegría que fueron surgiendo en este tiempo.

En particular y especialmente, quiero agradecer a Nati, por el amor y la contención. Por apoyarme y aconsejarme siempre para que mi vida sea mejor cada día. Por ser mi compañera de búsquedas. A Paco, mi perro, que siempre me saca una sonrisa.

Finalmente, quiero agradecer a todos aquellos que, de una u otra manera, me han brindado su apoyo y ayuda en la realización de esta tesis. Ha sido un privilegio y un honor ser parte de la comunidad científica y espero poder continuar contribuyendo al avance de la investigación en esta apasionante área de la ciencia.

RESUMEN

El SLAP_{TAG} es una nueva etiqueta molecular derivada del dominio proteico de unión a pared presente en la secuencia de la proteína de superficie SlpA (SlpA²⁸⁴⁻⁴⁴⁴) de *Lactobacillus acidophilus*. Proteínas con diferentes orígenes biológicos, con diferentes pesos moleculares o funciones bioquímicas, pueden fusionarse en fase con el SLAP_{TAG} y purificarse eficientemente mediante la unión específica a una matriz cromatográfica derivada de *Bacillus subtilis natto* llamada aquí Bio-Matrix (BM). Para establecer un protocolo optimizado para la cromatografía de afinidad basada en SLAP_{TAG} (SAC) se evaluaron diferentes condiciones de unión y elución. El equilibrio de unión entre SLAP_{TAG} y la BM se alcanzó después de unos 5 minutos a 4°C, siendo la constante de disociación aparente (K_d) de 4,3 μ M, un valor similar al determinado para otras proteínas de la capa S y sus respectivas paredes celulares bacterianas. Con el objeto de comparar la eficiencia de SAC respecto a un sistema comercial basado en una matriz de agarosa cargada con Ni²⁺ (IMAC), se generó una proteína reportera (H₆-GFP-SLAP_{TAG}), no observándose diferencias en el rendimiento de su purificación. Posteriormente, se evaluó la estabilidad en el tiempo de BM y el número de ciclos posibles de utilización y regeneración de la BM, determinándose que la matriz fue estable por más de un año, siendo posible reutilizarla hasta cinco veces sin una pérdida significativa en la eficiencia para la purificación de proteínas. Asimismo, se comprobó que la fusión a SLAP_{TAG} no interfiere en el correcto plegamiento proteico. Alternativamente, exploramos la elución de las proteínas fusionadas a SLAP mediante la proteólisis sitio-específica utilizando SLAP_{ASE} (una versión de la proteasa HRV-3c fusionada a SLAP_{TAG}) que permitió la liberación de GFP sin etiquetas (SLAP_{TAG}-less). Además, para evaluar el efecto del SLAP en la solubilización de proteínas que tienden a formar cuerpos de inclusión como el Toxoide Shiga o la proteína VP7 del virus de la lengua azul es que se construyeron proteínas quiméricas entre estas proteínas y el SLAP_{TAG}. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que SLAP_{TAG} no contribuye a la mejora en la solubilidad de las proteínas evaluadas en las condiciones ensayadas. Además, la fusión de SLAP_{TAG} a la proteína A/G con el fin de purificar anticuerpos resultó en la formación de cuerpos de inclusión.

Con el objeto de desarrollar nuevas aplicaciones se sintetizaron nanopartículas de hierro que se adhirieron a la BM, para generar una BM_{mag} que se adaptó con éxito para una SAC magnética, una técnica que se puede aplicar potencialmente para la producción y purificación de alto rendimiento de proteínas. En búsqueda de otras matrices de menor exigencia regulatoria se exploraron diferentes materiales alternativos para usar en la SAC en reemplazo de la matriz derivada de bacterias. De las potenciales matrices ensayadas (esponjas de poliuretano, bolitas de poliestireno, etc.) se encontró que las matrices de quitosano son adaptables a la SAC purificando las proteínas fusionadas a SLAP con eficiencia cercana a la BM.

PUBLICACIONES

Muruaga EJ, Briones G, Roset MS. Biochemical and functional characterization of *Brucella abortus* cyclophilins: So similar, yet so different. *Front Microbiol.* 2022 Oct 31;13:1046640. doi: 10.3389/fmicb.2022.1046640. PMID: 36386645; PMCID: PMC9659587.

Muruaga EJ, Uriza PJ, Eckert GA, Pepe MV, Duarte CM, Roset MS, Briones G. Adaptation of the binding domain of *Lactobacillus acidophilus* S-layer protein as a molecular tag for affinity chromatography development. *bioRxiv* 2022.12.24.521862; doi: <https://doi.org/10.1101/2022.12.24.521862>

INTRODUCCIÓN

PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

El interés por las proteínas está en constante aumento. La demanda de proteínas recombinantes ha crecido al ritmo de que nuevas aplicaciones de estas proteínas encuentran nuevos campos de aplicación industrial y se convierten en una realidad comercial [1]. En el año 2021, el mercado global de proteínas recombinantes se valoró en USD 556,6 millones y se espera que el tamaño de este mercado aumente a USD 1370,8 millones para el año 2030¹, a una tasa de crecimiento anual compuesta (CAGR) del casi 12% (Fig. 1).

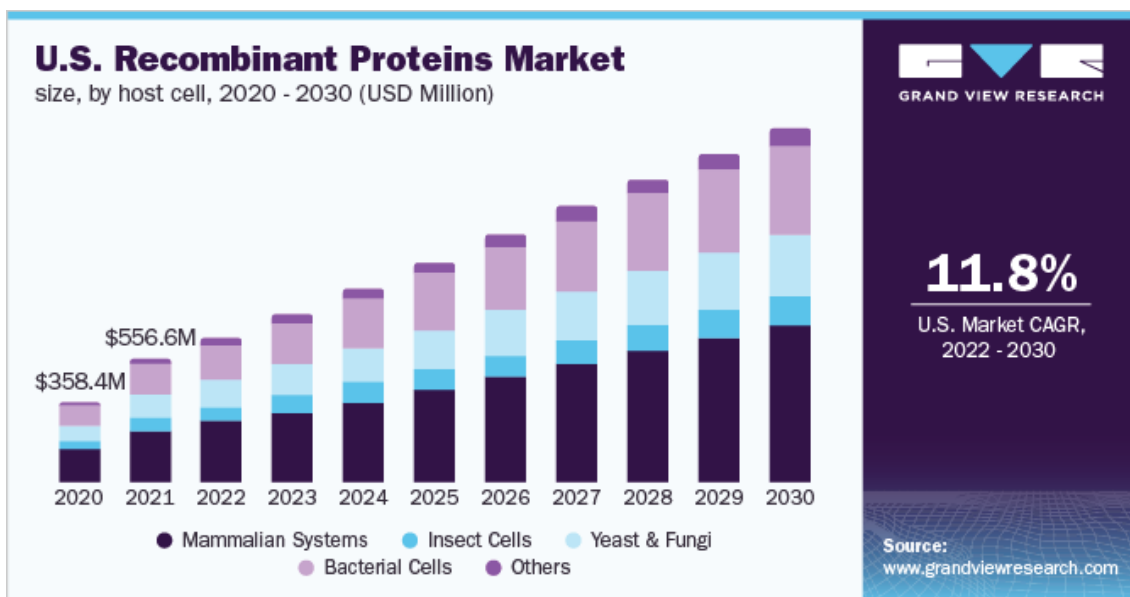


Fig. 1: Representación del crecimiento esperado del mercado de proteínas recombinantes por año y por sistema de expresión.

Dado que el número de genomas secuenciados está creciendo, la cantidad de información genética disponible que codifica para eventuales nuevas proteínas se halla en aumento [2]. Hasta febrero de 2023 se hallan anotadas más de 2337 millones de secuencias de DNA en GeneBank². Como consecuencia, la proteómica se ha convertido

¹ Información disponible en: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/recombinant-proteins-market-report>

² Información disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/statistics/>

en el foco de atención de la industria biotecnológica y la investigación científica [3], [4] demandando una producción cada vez mayor de proteínas puras para diversos fines [5]. En el campo de la medicina son utilizadas más de 170 proteínas recombinantes. Entre ellas encontramos anticuerpos monoclonales para tratamiento de cáncer, antígenos para vacunas, hormonas, etc.[1] Como consecuencia de este avance se han salvado innumerables vidas debido a la accesibilidad casi ilimitada de proteínas terapéuticas y profilácticas. Esto contrasta con lo que ocurría antes de la expansión de la biotecnología moderna donde sólo podían obtenerse cantidades pequeñas de proteínas puras y de fuentes de baja bioseguridad. El impacto de la producción de proteínas recombinantes también se ha extendido al desarrollo de bioinsecticidas, kits de diagnóstico, enzimas con numerosas aplicaciones y procesos de biorremediación, entre muchos otros. En particular, áreas como la producción de detergentes y el procesamiento de alimentos y bebidas han estado entre los éxitos más notables [6].

Las aplicaciones de las proteínas como productos comerciales pueden clasificarse en, al menos, tres áreas de interés: las enzimas de uso industrial; las proteínas de uso en el diagnóstico o para biocatálisis; las proteínas como biofármacos. La exigencia en el grado de pureza depende de la aplicación comercial [7]–[9]. Las enzimas de uso industrial como celulasas o sacarosas, que se producen en grandes cantidades y a bajo costo, son aceptadas para su aplicación generalmente con bajos niveles de purificación. Por otro lado, las proteínas de uso en el diagnóstico exigen un nivel de purificación intermedio, donde lo crucial es la eliminación de sustancias que puedan interferir en el análisis [7], [10]. Claro ejemplo son los anticuerpos de uso diagnóstico. En última instancia, las proteínas de uso farmacéutico exigen un altísimo grado de purificación. Entre ellas encontramos a la insulina y a los anticuerpos monoclonales terapéuticos [11].

No menos importante es la demanda de proteínas en el campo de la investigación. La ciencia requiere proteínas purificadas demandando técnicas cromatográficas ajustadas a la escala de laboratorio [2].

Tanto la comercialización de proteínas, como su uso en laboratorio, requiere un método de purificación eficiente y económico. El proceso de downstream implica varios pasos en

los que la proteína de interés se purifica conservando su actividad biológica. La cromatografía es el paso crítico y más costoso de dicho proceso [11]–[14].

PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS A LO LARGO DE LA HISTORIA

En el siglo XVIII, las proteínas fueron conocidas como una clase distinta de moléculas biológicas por Antoine Fourcroy y otros, quienes distinguieron estas moléculas por su capacidad para coagularse bajo tratamiento con calor o ácido (por ejemplo, albúmina de claras de huevo, albúmina de suero sanguíneo). Sin embargo, la primera técnica que permitió purificar proteínas fue la precipitación, método logrado en el siglo XIX y que prevaleció hasta la llegada de la cromatografía a mediados del siglo XX [15], [16].

La precipitación ha sido utilizada en la purificación de proteínas desde los primeros días de la investigación de proteínas, y las mediciones de precipitación también se han utilizado para comprender la termodinámica de las soluciones de proteínas [15]; esta dualidad se refleja en los estudios de Hofmeister de 1888 sobre los efectos de los iones en la precipitación de proteínas [17]. Hofmeister encontró que la capacidad de los iones de sal para precipitar proteínas en solución acuosa presentaba un cierto orden, que se denominó serie de Hofmeister. Los estudios posteriores han encontrado que muchas propiedades de la proteína, como el plegamiento de proteínas, el ensamblaje de subunidades y la cristalización, siguen la serie de Hofmeister[18].

Los objetivos de la purificación de proteínas, hasta la década de 1940, eran simplemente académicos. Hasta entonces se necesitaban proteínas puras solo para estudiar la estructura y probar las teorías rivales de los días anteriores al ADN.

Durante la segunda guerra mundial, una urgente necesidad de proteínas de la sangre impulsó a que Edwin Joseph Cohn desarrollara en 1946 técnicas para el aislamiento y purificación de albúmina y otras proteínas del suero [19], [20]. El proceso de Cohn, aún hoy utilizado, es una serie de pasos de purificación que se basa en la solubilidad diferencial de la albúmina y otras proteínas plasmáticas en función del pH, la concentración de etanol, la temperatura, la fuerza iónica y la concentración de proteínas.

Sin embargo, el gran hito en la purificación de proteínas fue la cromatografía [21]. Whatman había introducido en el siglo XVIII los intercambiadores de iones a base de celulosa seguidos de la introducción de intercambiadores de iones a base de dextrano de Pharmacia [2]. Los intercambiadores de iones comenzaron a ser utilizados desde entonces y se han vuelto indispensables en la purificación de proteínas. Tan solo unos años después que en 1907 Michael Tswett desarrollara la cromatografía líquida en columna para la separación de pigmentos de plantas [22], en 1910 Emil Starkenstein, estudiando la separación de una macromolécula (α -amilasa hepática) a través de interacciones con un sustrato inmovilizado (almidón), describió conceptualmente la cromatografía de afinidad [23], [24]. El método utilizado por Starkenstein, que se basó en las interacciones naturales que ocurren entre la α -amilasa y el almidón, el sustrato de esta enzima, no solo fue el primer ejemplo conocido de cromatografía de afinidad, sino que también fue uno de los primeros ejemplos de una separación en la que se utilizó cromatografía líquida con una enzima o proteína [23].

En los años siguientes aparecieron muchos trabajos sobre la amilasa donde se describen métodos similares al utilizado por Starkenstein. El fundamento general de la técnica también se adoptó para la purificación o el aislamiento de otras enzimas que tenían sustratos que podían obtenerse en forma sólida o en polvo y utilizarse como materiales de soporte [25]. Es el caso, entre otros ejemplos, de la purificación en 1934 de la proteasa pepsina usando como sustrato edestina [26] y de la purificación en 1957 de la enzima elastasa porcina para la cual se utilizó elastina en polvo [27].

A medida que se llevaban a cabo esfuerzos para purificar enzimas utilizando sustratos y soportes sólidos, también surgieron informes sobre la purificación de anticuerpos mediante su unión selectiva a ligandos biológicos. En 1920, Landsteiner había descubierto que los anticuerpos podían unirse a sustancias químicas específicas llamadas "antígenos", y que los antígenos grandes podían unirse con anticuerpos policlonales para formar complejos que precipitaban de una solución acuosa [28]. Este hallazgo llevó al desarrollo de un método conocido como inmunoprecipitación, que se convirtió en una herramienta importante para la caracterización y purificación de anticuerpos en la década de 1930. Por ejemplo, en 1934, Kirk y Sumner utilizaron la inmunoprecipitación

para purificar anticuerpos para la ureasa y demostrar que estos anticuerpos eran proteínas.

A pesar de que en ese momento no se conocía a este enfoque en particular como "cromatografía", la investigación demostró que el uso de la unión selectiva para la purificación y análisis no estaba restringido solamente a las interacciones entre enzimas y sustratos, sino que también podría extenderse a la unión entre anticuerpos y antígenos, y tal vez a otros tipos de sistemas biológicos [25].

La década de 1960 es considerada la época de la purificación de biomoléculas debido a que se produjeron una serie de desarrollos cruciales [29]. Uno de ellos fue la creación de agarosa en forma de cuentas por Hjerten en 1964, lo que permitió una mayor eficiencia y adaptabilidad en la cromatografía líquida de proteínas y biopolímeros que la celulosa. En 1967, Axen, Porath y Ernback describieron el método de inmovilización de macromoléculas a las matrices cromatográficas con bromuro de cianógeno, que permitió la unión covalente de péptidos y proteínas a materiales basados en polisacáridos. Un año después, Pedro Cuatrecasas, Meir Wilchek y Chris Anfinsen combinaron estos dos enfoques al inmovilizar inhibidores de nucleasas en agarosa en forma de cuentas mediante el método de bromuro de cianógeno. Estos soportes se utilizaron para purificar varias enzimas y el método se denominó "cromatografía de afinidad". Muchos otros científicos adaptaron esta técnica y la utilizaron ampliamente [30]. Por este tiempo el deseo de caracterizar enzimas motivó el desarrollo de métodos de purificación dando lugar a una importante variedad de matrices cromatográficas con diversos ligandos inmovilizados [25], [30]. Así, en la década de 1970 comenzaron a aparecer técnicas que incluyeron la de cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC) [31], cromatografía de afinidad colorante-ligando [32] y cromatografía de afinidad de boronato [33].

Con la tecnología de ADN recombinante advino el desarrollo de sistemas de producción de proteínas recombinantes. Así, se hizo posible la sobreexpresión y modificación de proteínas de interés [25]. Desde entonces, la técnica se ha ido perfeccionando con el desarrollo de etiquetas proteicas para novedosas cromatografías de afinidad. Esta

tecnología permitió la producción de proteínas recombinantes en diferentes sistemas de expresión (por ejemplo, células procariotas y eucariotas) [34]–[37].

SEPARACIÓN: CROMATOGRAFÍAS

La purificación de proteínas incluye varios pasos que permiten el aislamiento de los componentes proteicos de una mezcla para finalmente obtener la proteína deseada purificada del resto de las demás proteínas, conservando su actividad biológica y su integridad química [13], [38], [39].

Los pasos de separación pueden explotar las diferencias en las propiedades químicas/estructurales/funcionales entre la proteína de interés y otras proteínas de la mezcla cruda (Tabla 1).

Separación	Base de separación	Resolución
<i>Precipitación</i>		
Sulfato de amonio	Solubilidad	Baja
Disolventes orgánicos	Solubilidad	Baja
Polietilenimina	Carga, tamaño	Baja
Polietilenglicol	Solubilidad	Baja
Punto Isoeléctrico	Solubilidad, pI	Baja
Precipitación de afinidad	Reconocimiento molecular, Solubilidad	Baja
<i>Partición de fases con solventes</i>		
Partición acuosa bifásica	Solubilidad/hidrofobicidad	Baja /Media
Partición trifásica	Solubilidad/hidrofobicidad	Baja /Media
<i>Cromatografía</i>		
Intercambio iónico	Carga, distribución de cargas	Alta
Interacción hidrofóbica	Hidrofobicidad	Alta
HPLC de fase reversa	Hidrofobicidad, tamaño	Alta
Cromatografía de afinidad	Reconocimiento molecular	Alta
Filtración de gel/exclusión de tamaño	Tamaño, forma	Alta

Tabla 1: Base fisicoquímica de los métodos comunes de bioseparación.

Las propiedades utilizadas en la separación incluyen tamaño, forma, carga, punto isoeléctrico, distribución de carga, hidrofobicidad, solubilidad, densidad, afinidad de unión al ligando, unión a metales, asociación reversible, modificaciones post-traduccionales y secuencias o estructuras específicas (Fig. 2). Al explotar estas variaciones en las propiedades físicas y químicas entre las proteínas, se pueden diseñar varios pasos cromatográficos o de fraccionamiento diferentes para el desarrollo de un esquema de purificación viable y efectivo [2].

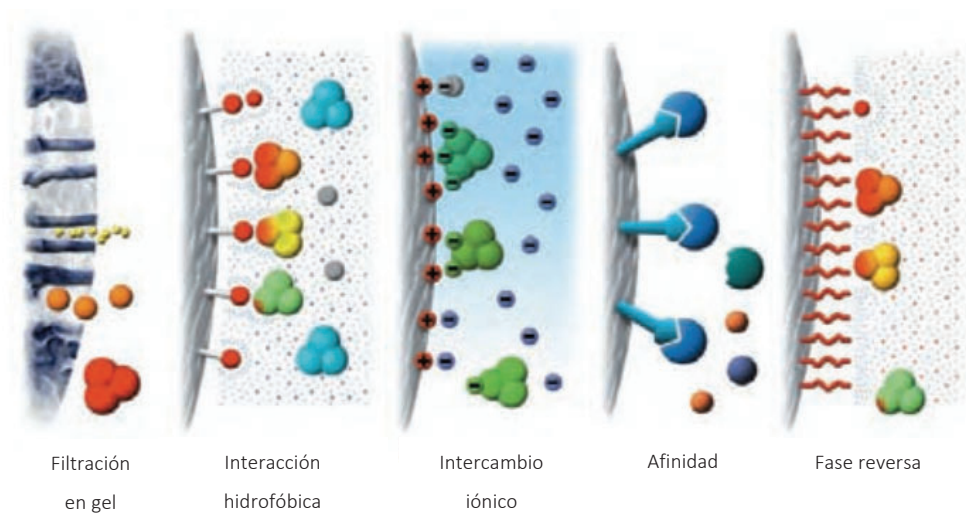


Fig. 2: Representación de ejemplos de separaciones basadas en propiedades fisicoquímicas diferenciales de las proteínas de interés. Se muestra la filtración en gel, las cromatografías de interacción hidrofóbica, de intercambio iónico, afinidad y fase reversa. [40]

CROMATOGRAFÍAS DE AFINIDAD

La cromatografía de afinidad es una forma de cromatografía líquida que utiliza un agente de unión biológicamente relacionado como fase estacionaria [41]–[44]. Esta técnica se ha utilizado durante décadas para el aislamiento y la purificación de blancos específicos aprovechando la unión selectiva y reversible que se produce en muchas interacciones biológicas [45]–[47].

Ejemplos de estas interacciones son las que ocurren entre un anticuerpo y un antígeno, una enzima y un sustrato, o una hormona y un receptor [41], [42]. La cromatografía de afinidad hace uso de estos sistemas inmovilizando uno de los pares de agentes que interactúan en un soporte cromatográfico (Fig. 3). El agente que se inmoviliza en el

soporte se conoce como el "ligando de afinidad" y proporciona una matriz con la capacidad de retener selectivamente el objetivo complementario incluso cuando este compuesto está presente en una mezcla compleja (Fig. 3B) [48].

El formato más simple y común para la cromatografía de afinidad es el modo de encendido/apagado [42], el cual se representa en la Fig. 3. En este formato, se utiliza un buffer de unión para pasar primero la muestra a una matriz que puede capturar y retener la molécula blanco. El buffer de unión generalmente imita el pH y la fuerza iónica en la que el ligando de afinidad está completamente activo y tiene su unión más fuerte al blanco. En presencia del buffer de unión, el blanco se retiene mientras que otros componentes de muestra percolan libremente. A continuación, se utiliza una fase móvil fuerte, o buffer de elución, que posibilita que la matriz libere el blanco, recuperándolo con cierto grado de pureza. La liberación del blanco al cambiar el pH, la fuerza iónica o la composición de la fase móvil se conoce como elución no específica [42], [49], [50].

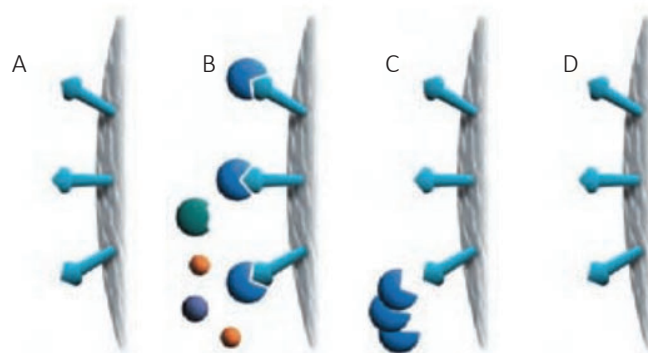


Fig. 3: Esquema de una cromatografía de afinidad. A: Ligando inmovilizado sobre matriz cromatográfica. B) Molécula blanco interacciona con ligando y es retenida, mientras el resto de la muestra no se retiene. C) La molécula blanco es eluída y recuperada pura al cambiar el pH, la fuerza iónica o la composición de la fase móvil. D) Se recupera la matriz cromatográfica. [40]

CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD MEDIANTE FUSIÓN A ETIQUETAS PROTEICAS

Comúnmente la purificación por cromatografía de afinidad se logra mediante fusión traduccional gracias a la ingeniería genética. La adición de etiquetas moleculares (o tags) es quizá la aplicación más común de la fusión génica. Estas etiquetas generalmente se fusionan con una proteína blanco, y permiten que las proteínas químicas sean

capturadas y purificadas selectivamente a través de la asociación con una resina de afinidad específica de la etiqueta, o por precipitación o agregación altamente selectiva dependiente de la etiqueta [51]–[53].

Además de su empleo en purificación las etiquetas de afinidad se pueden usar en muchas otras aplicaciones (Fig. 4), incluido el etiquetado para detección en estudios de imágenes y localización, potenciadores de la solubilidad, interacciones proteína-proteína y localización o transducción subcelular [53], [54]. En los casos en que se requiere una proteína nativa sin etiquetar, la etiqueta generalmente se puede eliminar mediante una variedad de métodos una vez que se purifica el blanco [53], [55].

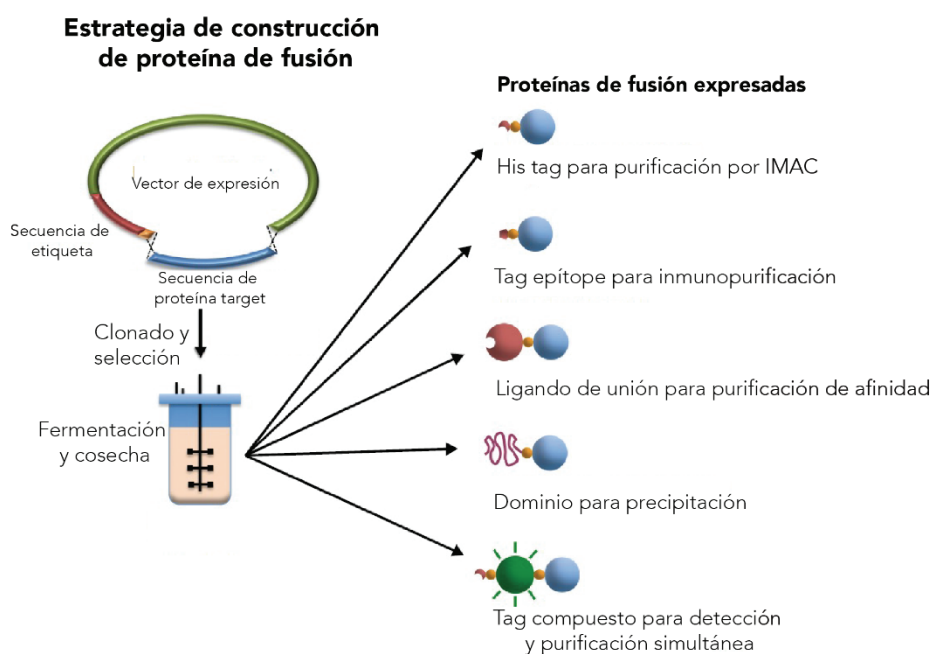


Fig. 4: Representación esquemática de estrategias básicas de clonación y modalidades de purificación comúnmente utilizadas. Aunque se han desarrollado muchas etiquetas novedosas, la mayoría de ellas se ajustan a una de las modalidades básicas que se muestran a la derecha. [52]

Las etiquetas de afinidad varían en tamaño, desde unos pocos aminoácidos hasta proteínas enteras [2]. La etiqueta de afinidad se puede introducir en ambos extremos de la proteína de interés, y la mayoría se coloca en el C-terminal [56]. Estas etiquetas deben exhibir algunas características, como estabilidad, selectividad y unión reversible a sus pares de unión [57], [58]. Idealmente, la disociación del sistema etiqueta-receptor debe

realizarse en condiciones suaves para facilitar la recuperación de la proteína de fusión en su forma activa [53].

Existe una amplia gama de etiquetas de afinidad desarrolladas para ser utilizadas en la producción y purificación de proteínas recombinantes, que se pueden agrupar en dos categorías principales: etiquetas de afinidad proteica y etiquetas de afinidad peptídica. Las etiquetas de afinidad de proteínas incluyen enzimas (por ejemplo, GST), proteínas de unión a polipéptidos (por ejemplo, SpA) y dominios de unión a carbohidratos (por ejemplo, MBP, CBD) (Tabla 2).

Tipo de etiqueta de afinidad	Tamaño (kDa)	Ligando
<i>Enzimas</i>		
β -Galactosidasa	116	Tiogalactosidil-sepharose
Glutación-S-transferasa 26	26	Glutación-sefarosa
Cloranfenicol acetil transferasa	24	Cloranfenicol-sefarosa
Tiorredoxina	12	Requiere un tag de purificación
<i>Proteínas de unión a polipéptidos</i>		
Proteína estafilocócica A	14-31	IgG
Dominios ZZ	7	Proteína A
Dominio de unión a albúmina	75-25	I-Albumina
Dominio de unión al fosfato	34	Hidroxipatita
<i>Dominios de unión a carbohidratos</i>		
Dominio de unión a maltosa	40	Amilosa cross-linkada
Dominio de unión a celulosa	100	Celulosa
Dominio de unión de almidón	133 aa	Almidón
Exoglucanasa CBD	128 aa	Celulosa
<i>Otras etiquetas de proteínas</i>		
Sustancia de utilización de N (NusA)	55	Requiere un tag de purificación
Modificador de ubiquitinas pequeñas (SUMO)	11	Requiere un tag de purificación

Tabla 2: Ejemplos de etiquetas o tags de afinidad. [53]

El uso de etiquetas peptídicas pequeñas presenta algunas ventajas sobre las etiquetas más grandes, por ejemplo, en términos de metabolismo de la célula huésped, ya que se consume menos energía durante la producción de proteínas de fusión [57]. Además, es

menos probable que las etiquetas cortas interfieran con la estructura y función de la proteína blanco; por lo tanto, es posible que no sea necesario eliminarlos posteriormente [56]. Los péptidos pequeños utilizados como etiquetas de afinidad se dividen en dos categorías: los péptidos que se unen a ligandos pequeños (por ejemplo, poliarginina y polihistidina) y las etiquetas peptídicas que son reconocidas por proteínas (por ejemplo, FLAG) (Tabla 3). Las etiquetas de afinidad basadas en péptidos pequeños también se pueden clasificar en: (a) etiquetas de afinidad metálica; b) péptidos cargados; c) péptidos epítopos; d) péptidos de unión a proteínas; y (e) proteínas de unión a estreptavidina [59]. La presencia de la etiqueta de afinidad puede afectar a las características o funciones de la proteína blanco y, dependiendo de su aplicación final, podría ser necesario eliminar la etiqueta [56]. Específicamente, en el caso de las proteínas terapéuticas, existe una demanda de escisión de la etiqueta, ya que la función de la proteína puede perderse y su integridad y actividad biológica se ven comprometidas debido a la presencia de la etiqueta [9], [60], [61]. Una variedad de peptidasas y otros métodos químicos están disponibles para la escisión de la etiqueta [55], [56]

Tipo de etiqueta de afinidad	Secuencia del tag	Ligando
<i>Etiquetas de afinidad metálica</i>		
Poly-His	HHHHHH	Ni ²⁺ +NTA, CO ₂ +CMA Colorante fluoresceínico bis-arsenical
FLAsH tag	CCXXCC	FLAsH
HAT	KDHLIHVHLEEHAAHANK	CO ₂ + CMA
<i>Péptidos cargados</i>		
Poly-Arg	5–15 aa	Resinas aniónicas
Poly-Asp	5–16 aa	Resinas catiónicas
Poly-Cys	4 aa	Tiopropyl sefarosa
Glu	1 aa	Resinas catiónicas
Poly-Phe	11aa	IEC
<i>Péptidos epítopos</i>		
FLAG™	DYKDDDDK	mAb M1, M2
c-myc	EQKLISEEDL	mAb 9E10
T7	MASMTGGQQMG	Anti-T7 9E10
<i>Péptidos de unión a proteínas</i>		
S-tag	KETAAAKFERGHMDS	Proteína S
Proteína de unión a calmodulina	KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL	Calmodulina

<i>Proteínas de unión a estreptavidina</i>		
Bio tag	LGIFEAMKMEWR	Estreptavidina
Strep-tag	SAWRHPQFGG	Estreptavidina
Strep-tag II	WHPQFEK	Estreptactina
Avi tag	GLNDIFEAQKIEWHE	Estreptavidina
Nanotag	DVEAWLGAR	Estreptavidina

Tabla 3: Ejemplos de dominios nativos de proteínas como etiquetas de afinidad. [2]

Sin duda, la etiqueta de purificación más utilizada es la etiqueta de polihistidina, o His_{TAG} [62]. Ésta se caracteriza por ser pequeña, económica de usar y, por lo general, tiene un efecto mínimo o nulo en la estructura o función de la proteína blanco [63], [64]. El pequeño tamaño de la etiqueta permite que se agregue independientemente a cualquiera de los extremos de una proteína blanco dada, y no requiere un plegamiento específico para funcionar, lo que la hace altamente confiable en todos los sistemas de expresión principales. Asimismo, presenta la ventaja de permitir la purificación de proteínas desnaturalizadas recuperadas de cuerpos de inclusión. Además, varios vectores de expresión están disponibles comercialmente para la fusión a His_{TAG}, y los anticuerpos anti- His_{TAG} están disponibles para la detección de inmuno-ensayos [10].

REMOCIÓN DEL TAG

La eliminación de la etiqueta de afinidad puede llevarse a cabo mediante tratamientos químicos agresivos (por ejemplo, bromuro de cianógeno o hidroxilamina) o por escisión enzimática, siendo esta última preferida ya que se puede realizar en condiciones fisiológicas (Arnau et al., 2006). El tratamiento químico presenta inconvenientes significativos como la desnaturalización de proteínas y la modificación de la cadena lateral de aminoácidos en la proteína de interés [2]. Se han utilizado varias endoproteasas para la eliminación de etiquetas [55], [65], como la enteroquinasa [66], la proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV) [67], la proteasa 3c de Rinovirus humano (HRV-3c) [68], el factor Xa [69], la trombina [69] y la proteasa SUMO [70]. La enteroquinasa (EK) es una serina proteinasa constituida por una cadena alta y una cadena ligera unidas por un

enlace disulfuro. Esta enzima presenta una alta especificidad para la secuencia (Asp)⁴-Lys, lo que contribuye a una herramienta útil para la escisión de proteínas de fusión [66]. La proteasa HRV-3c o PreScissionTM, escinde entre los residuos de glutamina y glicina del sitio canónico LEVLFQ/GP [68]. El factor Xa y la trombina son serina proteasas similares a la tripsina y ambos reconocen secuencias específicas de aminoácidos (Tabla 4) [69]. TEV es una proteinasa de 49 kDa del virus del grabado del tabaco (TEV) que escinde la poliproteína derivada del ARN genómico TEV en cinco ubicaciones [67]. La mayoría de estas enzimas son capaces de clivar sin requerir una secuencia específica en el C-terminal, lo que permite la eliminación completa de la etiqueta [56]. El principal inconveniente asociado con estas enzimas está relacionado con las altas proporciones enzima proteína y los largos tiempos de incubación requeridos. Además, para una eliminación eficiente de la etiqueta, también es necesario tener en cuenta la ausencia de sitios críticos reconocidos por las endoproteasas en la secuencia de proteínas nativas [55], [56].

Agente de clivaje	Especificidad de clivaje
<i>Enzimas</i>	
<i>Exopeptidasas</i>	
Carboxipeptidasa A	Poly H—↓—X
Carboxipeptidasa B	Poly R—↓—X
Aminopeptidasa I	EAE—↓—X
<i>Endopeptidasas</i>	
Enteroquinasa	DDDDK—↓—X
Factor Xa	IEGR—↓—X
Trombina	LVPR—↓—X [101]
Proteasa TEV	EQLYFQ—↓—X
SUMO	Estructura terciaria de Sumo
HRV-3c	LEVLFQ—↓—GP
<i>Químico</i>	
Bromuro de cianógeno	XM—↓—X
Hidroxilamina	XN—↓—G
Ácido acético	XN—↓—P

Tabla 4: Resumen de métodos enzimáticos y químicos para la eliminación de etiquetas. ↓ = indica el sitio de escisión química; X = aminoácido inespecífico [2]

La escisión de etiquetas mediante el uso de métodos enzimáticos o químicos usualmente requiere pasos de purificación adicionales. De esta manera, se han desarrollado otras tecnologías emergentes, a saber, etiquetas autocortantes [71], [72]. Existen diferentes tipos de etiquetas de autoescisión, como inteínas, Sortasa A (SrtA), proteasa N-terminal (N(pro)) y el módulo FrpC [72]–[76]. En este caso particular, estas etiquetas presentan actividad proteolítica inducible bajo ciertas condiciones, como el cambio de pH y/o temperatura y la adición de reactivos específicos (por ejemplo, dithiothreitol (DTT), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y Ca^{2+}) [71]. Aunque estas etiquetas autoescindibles parecen ser atractivas desde el punto de vista económico, todavía hay algunos inconvenientes asociados con la escisión prematura y, en consecuencia, las pérdidas de proteínas blanco y la menor compatibilidad del producto con las condiciones de escisión [53], [77].

SOPORTES EN CROMATOGRAFÍAS DE AFINIDAD

Diversos materiales y matrices se han utilizado como soportes para cromatografía de afinidad [29], [78]. En la Fig. 5 se observan ejemplos de estos soportes y una indicación del uso relativo.

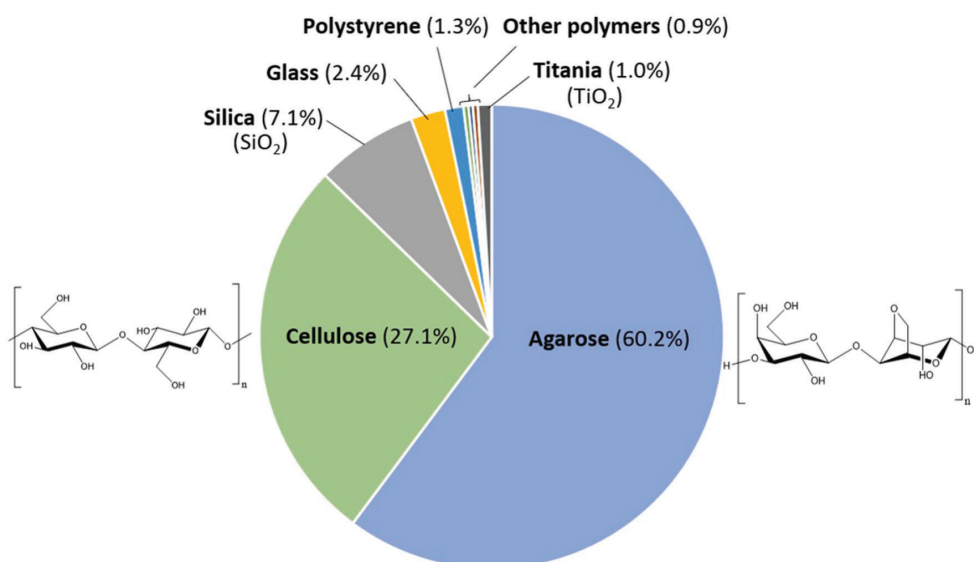


Fig. 5: Ejemplos de materiales utilizados como soportes cromatográficos. Para cada uno se indica el uso relativo en porcentajes. [29]

Desde la publicación de 1968 de Cuatrecasas [30] la agarosa ha permanecido como un soporte popular para la cromatografía de afinidad. Las ventajas de usar agarosa como soporte para la cromatografía de afinidad son su bajo costo, su gran tamaño de poro (por ejemplo, para separaciones de biomoléculas o inmovilización), su baja unión inespecífica para muchos agentes biológicos y su buena estabilidad en un amplio rango de pH [42]. Estas características han hecho de la agarosa un material común en la cromatografía de afinidad tanto para la purificación a gran como a pequeña escala de proteínas blanco, como se indica en la Fig. 5 [79]. Sin embargo, la agarosa tiene una estabilidad mecánica limitada cuando se trabaja en altas presiones de funcionamiento. Este factor tiende a limitar el uso de agarosa como soporte en separaciones a escala analítica basadas en cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) [79].

Otros tipos de carbohidratos también se han empleado como soportes en la cromatografía de afinidad [79]. La celulosa, ejemplo principal entre los carbohidratos (Fig. 5), se usó comúnmente en las primeras aplicaciones de cromatografía de afinidad que aparecieron para la purificación de anticuerpos o enzimas en las décadas de 1950 y 1960 [80], [81]. Aunque la celulosa actualmente no es tan popular como la agarosa para muchas aplicaciones de cromatografía de afinidad, este material se utiliza a menudo en separaciones de afinidad basadas en membrana [29].

Una variedad de polímeros orgánicos también se ha utilizado como soporte para la cromatografía de afinidad. Muchos de estos polímeros orgánicos se han basado en poliestireno, poliuretano, polipropileno o polimetacrilato [79]. Otros polímeros de gran difusión son la quitina y el quitosano [82]–[85].

SISTEMAS DE EXPRESIÓN

A medida que la industria biotecnológica se ha expandido en los últimos años, se ha profundizado en la utilización de diversos sistemas de expresión que permitan la producción de un espectro muy amplio de proteínas recombinantes [86]. Existen diferentes criterios al momento de elegir uno u otro sistema (Fig. 6). Por ejemplo, los

sistemas de expresión bacterianos suelen ser más atractivos debido a su simplicidad, métodos bien establecidos para la manipulación genética, altos rendimientos de producción, expresión rápida y rentabilidad. Sin embargo, un inconveniente importante es que la expresión de proteínas puede conducir a la formación de agregados insolubles. Estos agregados, denominados cuerpos de inclusión, están formados por polipéptidos desnaturalizados o muy mal plegados [87]. Asimismo, los volúmenes y costos de producción han de ser tenidos en cuenta al momento de elegir un adecuado sistema de expresión. En algunas aplicaciones, como investigación o algunos screenings, se necesitan proteínas en cantidades relativamente pequeñas, mientras que en otros casos, se necesitan cantidades cercanas a la escala de toneladas, como es el caso de la industria terapéutica [88]. De igual modo, las características particulares de la proteína que se desea expresar condicionan el sistema de expresión a elegir. Por ejemplo, la necesidad de una determinada glicosilación favorecerá el uso de cierto sistema por encima de otros [89].

Actualmente existe una variedad de alternativas de sistemas de expresión que han sido desarrollados, y que siguen desarrollándose, para atender a las diferentes necesidades de la industria. Entre los sistemas más utilizados cabe mencionar sistemas bacterianos (principalmente *Escherichia coli*) [37], [90], células de mamíferos (por ej. células de ovario de hámster chino, CHO) [35], [36], levaduras (por ej. *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*), algas y células de insectos (utilizando baculovirus) [91]. Incluso se encuentran disponibles sistemas libres de células para la producción de proteínas recombinantes [92]–[94]. Cada sistema de expresión cuenta con vectores de expresión diseñados y optimizados especialmente para el sistema. En la figura 6 se sintetizan comparativamente algunas de las características de los principales sistemas.

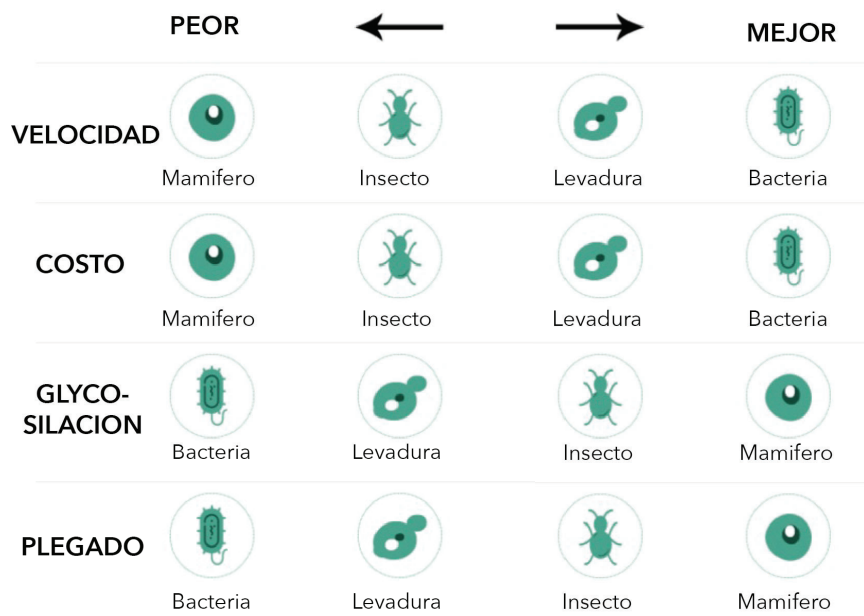


Fig. 6: Comparación de diversos sistemas de expresión de proteínas recombinantes³ según velocidad y costo del proceso, glicosilación y correcto plegamiento de las proteínas.

PROTEÍNAS DE CAPA S

Las capas S o S-layer (por “surface layer”) se encuentran tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas y son altamente prevalentes en las arqueas [95]. Se definen como matrices cristalinas bidimensionales (2D) que recubren toda la célula, y se cree que proporcionan propiedades funcionales importantes [96]. Las S-layers consisten en una o más proteínas (o glicoproteínas), conocidas como proteínas de capa S (SLPs), que tienen una tendencia natural a autoensamblarse para formar una matriz espaciada regularmente en la superficie de la célula[97]. Como las SLP son algunas de las proteínas más abundantes en la célula, su biogénesis consume considerables recursos metabólicos, lo que refleja su importancia para el organismo. Las S-layers fueron reconocidas por primera vez en la década de 1950 y se estudiaron en varias especies durante las décadas siguientes, lo que reveló detalles considerables de sus estructuras utilizando técnicas

³ Información disponible en <https://www.sinobiological.com/resource/protein-review/protein-production-systems> . Último acceso: 24 de abril de 2023.

como la microscopía electrónica [97]. Tales estudios mostraron S-layers estructuralmente diversas, con simetrías de red oblicuas (p1, p2), cuadradas (p4) o hexagonales (p3, p6) (Fig. 7). Algunas especies Gram-positivas albergan familias de proteínas que contienen SLP y proteínas relacionadas con SLP que comparten un mecanismo común de anclaje de la pared celular. Sin embargo, aún no está claro si todos los miembros de la familia contribuyen al autoensamblaje de la capa S [98]. Organismos modelos como *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* carecen de capa S.

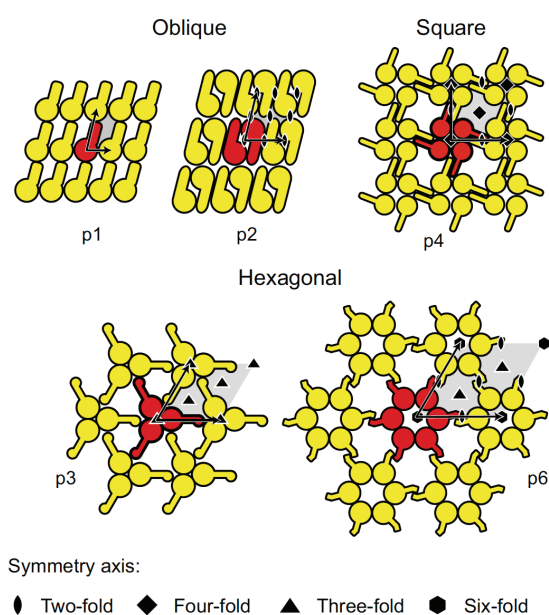


Fig 7: Esquemas de capas S con diversas simetrías [98]

La gran cantidad de información acumulada sobre los principios generales de las capas S condujo a un amplio espectro de aplicaciones [98]–[102]. Lo más relevante para la investigación aplicada de la capa S es la capacidad de las (glico)proteínas de capa S aisladas para ensamblarse en orientaciones definidas en matrices cristalinas en suspensión o en superficies o interfaces adecuadas [103]. Como las capas S son estructuras periódicas, exhiben propiedades fisicoquímicas idénticas repetitivas hasta la escala del subnanómetro y poseen poros idénticos en tamaño y morfología. Lo más importante es que las propiedades de las proteínas de la capa S pueden cambiarse mediante modificaciones químicas e ingeniería genética. Las capas S también representan una base estructural única y un elemento de generación de patrones que permite ensamblajes supramoleculares complejos [103]–[105].

LACTOBACILLUS Y SLPA

Lactobacillus es un género de bacterias con más de 50 especies, que se utilizan desde hace siglos para el procesamiento y la preservación de alimentos [106]. Se encuentran comúnmente en las cavidades oral, vaginal y regiones intestinales de los animales y los humanos. Son microorganismos industrialmente importantes que contribuyen a la producción de queso, yogur, leches fermentadas, embutidos cárnicos y alimentos funcionales entre los cuales se encuentran los probióticos, definidos como microorganismos vivos que ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped al ser administrados en cantidades adecuadas más allá de los efectos nutricionales habituales [106], [107]. Las envolturas en bacterias Gram positivas están constituidas por una membrana celular y una gruesa pared formada por cadenas de peptidoglicano (PG) entrecruzadas por cadenas de ácidos teicoicos: los WTA (wall teichoic acid) asociados a pared y los LTA (lipoteicoicos) anclados a la membrana. En algunas especies, las paredes se rodean de proteínas de superficie que constituyen la capa-S como muestra la figura 8 [108], [109]. Las proteínas S-layer se encuentran ancladas a los ácidos teicoicos (LTA y WTA), y se ha propuesto que la interacción de los aminoácidos básicos en la región C-terminal de la proteína S-layer y estos polímeros secundarios de carga negativa sería en parte responsable de mediar la unión a la pared celular [110], [111]. Se observa que en lactobacilos la capa S tendría un rol en las propiedades probióticas de las cepas que la poseen siendo capaz de influir en la respuesta inmune y en muchos casos favoreciendo la adhesión a células, con función de adhesina, facilitando que la bacteria se adhiera a distintas superficies. Varios trabajos involucran directamente a las S-layer en los fenómenos de exclusión de patógenos entéricos [112].

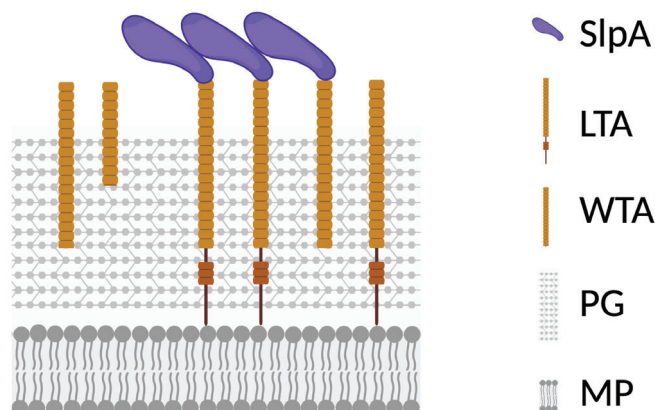


Fig. 8: Representación de la pared celular de *Lactobacillus acidophilus*. WTA = ácido teicoico de pared; LTA = ácido lipoteicoico; PG = peptidoglicano; MP = membrana plasmática. Creado con BioRender.com.

EL DOMINIO PROTEICO dSlp-A

La capa S de *Lactobacillus acidophilus* está compuesta principalmente por SlpA⁴, aunque también presenta proteínas menos abundantes como SlpX [108], [113]. SlpA fue purificada y caracterizada por primera vez en 1993 [114], siendo una proteína de 446 aminoácidos con un peso molecular de 43 KDa. La secuencia se presenta en la figura 9.

1	MKKNLRIVSA	AAALLAVAPV	AASAVSTVSA	ATTINASSSA	INTNTNAKYD	VDVTPSVSAV
61	AAVAANTANN	TPAIAGNLTG	TISASYNGKT	YTANLKADTE	NATITTAAGST	TAVKPAELAA
121	GVAYTQTVND	VSFNFGSENA	GKTVTLGSAN	SNVKFTGTNS	DNQTEQVST	LKVKLDQNGV
181	ASLTNVSIAA	VYAINSTDNS	NVNFYDVTSG	ATVTNGAVSV	NADNQGQVNV	ANVVAAINSK
241	YFAAQYADKK	LNTLTANTED	AIKAALKDQK	IDVNSVGYFK	APHTFTVNVK	<u>ATSNTNGKSA</u>
301	<u>TLPVVVTVPN</u>	<u>VAEPTVASVS</u>	<u>KRIMHNAYYY</u>	<u>DKDAKRVGTD</u>	<u>SVKRYNSVSV</u>	<u>LPNTTNGK</u>
361	<u>TYIQVVENGG</u>	<u>AVDKYINAAN</u>	<u>IDGTRKRLKH</u>	<u>NAYVYASSKK</u>	<u>RANKVVLKKG</u>	<u>EVVTTYGASY</u>
421	<u>TFKNGQKYYK</u>	<u>IGDNTDKTYV</u>	<u>KVANFR</u>			

Fig. 9: Secuencia aminoacídica de SlpA de *Lactobacillus acidophilus*. En rojo se indica la región dSLP-A, con los dominios SLP-A subrayados, según predicción de InterProScan.

La proteína de Capa-S denominada SlpA posee dominios proteicos que le confieren su función estructural en la pared del *L. acidophilus*. Como se muestra en la figura 10, el dominio responsable del anclado a membrana del *Lactobacillus* se encuentra codificado en los últimos 159 aminoácidos de la proteína SlpA. [106]

⁴ NCBI Accesion number: WP_125977721. Disponible en:

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_125977721.1?report=genbank&log\\$=protalign&blast_rank=1&RID=X2WFNGZF016](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_125977721.1?report=genbank&log$=protalign&blast_rank=1&RID=X2WFNGZF016)



Fig. 10: Esquema de la secuencia de DNA correspondiente a la proteína SlpA de *Lactobacillus acidophilus* indicando los dominios presentes. PS: péptido señal; autoensamblado: dominio de interacción inter-SlpA que determina la formación de la Capa S sobre la pared de *Lactobacillus*. Anclado: región de anclaje a la pared formado por dos dominios SLP-A.

SlpA codifica en su carboxi-terminal (SlpA²⁸⁷⁻⁴⁴⁶) dos copias en tándem del dominio proteico denominado SLP-A (pfam: 03217), de unos 60 aminoácidos cada uno. Esta una región (dSLP-A, doble SLP-A) demostró ser necesaria y suficiente para la asociación de SlpA a la pared celular bacteriana [111]. El ácido lipoteicoico y el ácido teicoico de pared presentes en la pared celular bacteriana de los lactobacilos se han caracterizado como ligandos naturales para la región dSLP-A [111]. El dominio SLP-A se encuentra solo en especies de *Lactobacillus*, limitadas a lactobacilos formadores de la capa S del grupo *L. acidophilus*, incluidos *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gallinarum* y *Lactobacillus amylovorus* [115]. Este dominio también se encuentra en proteínas asociadas a la capa S [113] relacionadas con la actividad probiótica (Naidu et al., 1999), la adhesión [117], la inmunomodulación [118] y la división celular [119].

ANTECEDENTES DEL LABORATORIO

Como antecedente se menciona el proyecto de investigación PICT-2013-0662 (AGENCIA-MinCyt) orientado al uso de *Lactobacillus* como carrier vacunal portador de antígenos de patógenos intestinales para el desarrollo de vacunas de administración oral. Algunos de los resultados se han publicado recientemente [106].

Resultados destacados del proyecto de investigación PICT-2013-0662 son los siguientes:

1. **Construcción de un vector para la expresión de antígenos de *Escherichia coli* O157 fusionados al carboxilo terminal de la SlpA de *L. acidophilus*.**

Se construyó un vector (pIIB-SLAP) que permite fusionar en fase la secuencia de la proteína de interés al dominio de unión a la pared del *Lactobacillus* (SlpA²⁸⁵⁻⁴⁴⁴, ahora llamada SLAP) utilizando sitios de restricción diseñados para este propósito. En este caso se utilizó una proteína antigénica quimérica formada por las proteínas EspA, Intimina y Tir (EIT). Estos antígenos fueron elegidos por su capacidad de inducir una respuesta inmune protectora contra el patógeno *Escherichia coli* O157:H7 [120] expresado en diferentes bacterias [120], [121].

Una vez hecha esta fusión la construcción resultante conteniendo EIT-SLAP puede movilizarse a vectores de expresión utilizando los sitios de restricción compatibles con los plásmidos de expresión pET (NdeI-EcoRI) (pET-EIT-SLAP) para fusión al TAG de histidinas, al pGEX2t (BamHI-EcoRI) (pGEX-EIT-SLAP) para fusiones a la proteína GST. El vector también permite movilizar las construcciones al vector pPIC9K (SnaBI-EcoRI) para expresión en levadura (pPIC9k-EIT-SLAP).

2. “Decorado” de *Lactobacillus acidophilus* con fusiones proteicas a SLAP.

Se clonó la secuencia de la proteína Glutathion S-transferase (GST) en el vector pIIB-SLAP. La proteína GST-SLAP se expresó en *E. coli* BL21 a partir del vector pGST-SLAP y fue purificada por su dominio de GST. La proteína purificada fue luego incubada en presencia de *Lactobacillus acidophilus* o *L. casei* (decapados previamente) para permitir la adhesión de la proteína GST-SLAP a la pared bacteriana, en un proceso que hemos denominado “decoración” (Fig. 11, panel superior). Como se observa mediante análisis de Western Blot (Fig. 11, panel inferior), la cantidad de GST-SLAP que se adhiere a la pared de *Lactobacillus* se incrementa con la cantidad de proteína incubada hasta un valor de saturación.

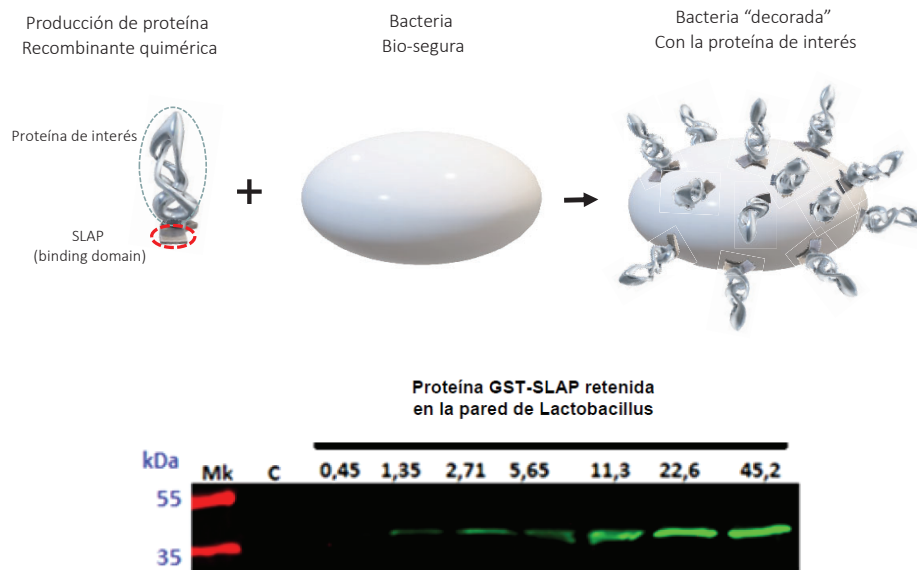


Fig. 11: Estudio de la adhesión de la proteína GST-SLAP adherida a la superficie de *L. casei*. En el panel superior se muestra un esquema del experimento y, en el inferior, el análisis de los resultados por Western blot, observándose que la cantidad de proteína adherida aumenta con la cantidad de proteína en la incubación.

Se realizaron preparados para observar bacterias decoradas por microscopia confocal. Como se observa en la Fig. 12, luego de la incubación de la bacteria con la proteína GST-SLAP, la proteína se distribuye homogéneamente en toda la superficie de *L. acidophilus*.

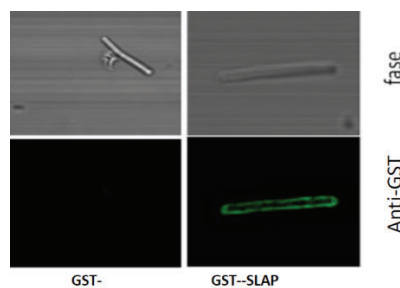


Fig. 12: Proceso de decoración de los lactobacilos a partir de proteínas fusionadas al dominio de unión a *Lactobacillus* (SLAP) de *Lactobacillus acidophilus*. La proteína adherida fue revelada sobre la bacteria mediante inmunofluorescencia confocal utilizando un anticuerpo dirigido contra la proteína GST.

Para evaluar si la decoración proteica de *L. acidophilus* se podía adaptar para generar una plataforma de vacuna oral, se construyó un antígeno quimérico derivado del patógeno

bacteriano *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC) fusionando las secuencias que codifican los polipéptidos EspA³⁶⁻¹⁹², Intimin⁶⁵³⁻⁹⁵³, Tir²⁴⁰⁻³⁷⁸ y H7 flagelina³⁵²⁻³⁷⁴ (EITH7) a SLAP (MBP-EITH7-dSLP-A) [106]. Los resultados mostraron que *L. acidophilus* decorado con EITH7-SLAP administrado por vía oral fue capaz de inducir una respuesta inmune en la mucosa intestinal y sistémica capaz de controlar la infección experimental con *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (*E. coli* O157:H7)

Considerando que proteínas etiquetadas con SLAP se podrían unir a cualquier bacteria que presente ácidos teicoicos en su pared, se decoraron *Bacillus subtilis* var. *natto* con las proteínas de fusión EITH7-dSLP-A y GST-dSLP-A (anteriormente mencionada como GST-SLAP). Si bien se perseguían fines vacunales, se encontraron resultados semejantes a los obtenidos con *L. acidophilus* respecto al decorado. Sin embargo, *Bacillus subtilis* tiene la ventaja de crecer en medio de cultivo LB y no poseer capa S, lo que evita tener que decapar la bacteria antes de decorarla. Se analizó por Western Blot y microscopía confocal para confirmar el decorado (Fig. 13).

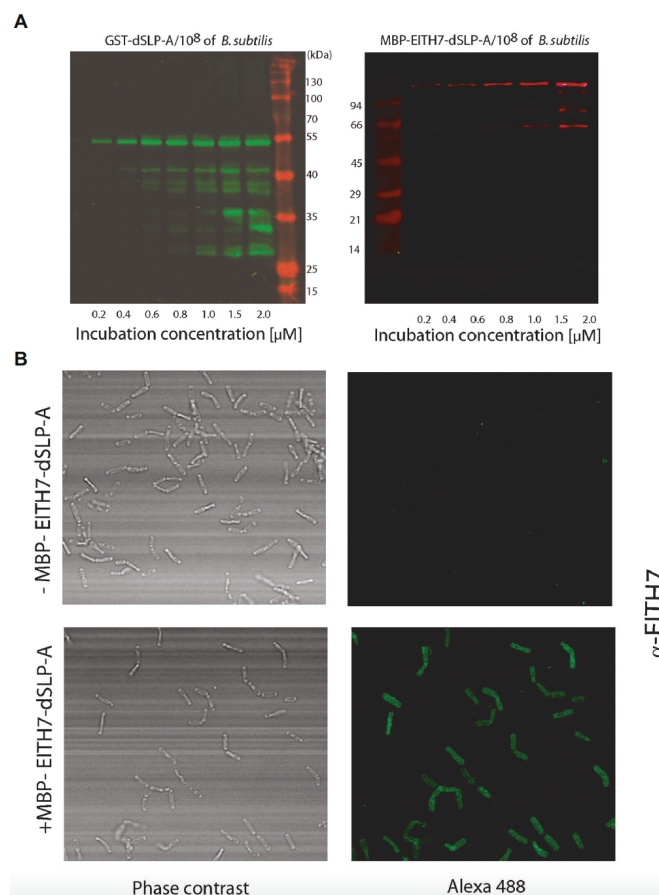


Fig. 13: (A) Análisis por Western blot del aumento en la unión de GST-dSLP-A (panel izquierdo) o MBP-EITH7-dSLP-A (panel derecho) a la superficie de *B. subtilis* que correlaciona con el aumento en la concentración de dichas proteínas en la solución de incubación. (B) Microscopía de inmunofluorescencia confocal de *B. subtilis* (panel superior) o *B. subtilis* decorada con MBP-EITH7-dSLP-A (panel inferior) revelado con anti-EITH7 como anticuerpo primario. [106]

A partir de estos antecedentes se postuló la utilización del dominio carboxiterminal de SlpA de *L. acidophilus* como etiqueta molecular de una nueva cromatografía de afinidad. Se obtuvo la evidencia experimental que da base al concepto, desarrollándose un prototipo inicial. Dado que este desarrollo reunía las características necesarias de novedad, altura inventiva y aplicación industrial se decidió aplicar para su patentamiento ante el Instituto Nacional de Patentes e Invenciones (INPI) bajo el título: “MATRIZ DE AFINIDAD, MÉTODOS DE AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE POLIPÉPTIDOS Y ANTICUERPOS, CONSTRUCCIONES, VECTORES Y CÉLULAS TRANSFECTADAS O TRANSFORMADAS”.

Los datos de la patente publicada se listan debajo:

- Número de solicitud: P170102992
- Fecha de la solicitud: 27.10.2017
- N.º de publicación: 111502
- Fecha de publicación: 24.07.2019
- Tipo de publicación: A1
- Solicitantes:
 - CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS (CONICET)
 - UNIVERSIDAD NACIONAL SAN MARTÍN (UNSAM)
- Inventores:
 - MARA SABRINA ROSET
 - GASTÓN EZEQUIEL ORTIZ
 - CARLOS GABRIEL BRIONES

Es esta tesis se generaron todos los elementos esenciales para el desarrollo de un prototipo comercial: protocolos estandarizados para uso en múltiples sistemas de expresión proteica más todos los elementos auxiliares para el establecimiento de un kit completo de purificación de proteínas. De acuerdo con la clasificación de la NASA que considera la escala de nivel de madurez tecnológica, puede decirse que el proyecto inicia en el nivel TLR2 llegando al final de esta Tesis a un nivel TLR5, validándose en su ambiente relevante y evaluada su eficiencia en distintas condiciones experimentales.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un sistema de expresión y purificación de proteínas recombinantes adaptando el dominio SLAP presente en el carboxilo terminal de la proteína de Capa-S denominada SlpA de *Lactobacillus* como etiqueta molecular, así como inmovilizar enzimas de interés biotecnológico mediante el mencionado dominio. El sistema propuesto utiliza la afinidad natural del dominio SLAP por los ácidos teicoicos, macromoléculas que se encuentran naturalmente distribuidos en las membranas de las bacterias Gram positivas. Esta tesis se enmarca en un proyecto que prevé la generación de todos los componentes requeridos para de un kit de purificación de proteínas que incluirá los vectores para expresión de las proteínas recombinantes en sistemas bacterianos y en levaduras, las proteasas sitio específica para la remoción del tag, distintas variantes de matrices de afinidad, y los anticuerpos específicos contra la etiqueta SLAP de manera de detectar la expresión de las proteínas etiquetadas con este dominio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. DESARROLLO DE LOS VECTORES DE EXPRESIÓN:

Diseño y construcción de una serie de vectores de expresión de proteínas recombinantes en distintos sistemas como bacterias, levaduras y células de mamífero utilizando el dominio SLAP de *Lactobacillus acidophilus*. Adicionar elementos para la ductilidad en la construcción de las proteínas recombinantes (sitios de clonados con múltiples sitios de restricción y sitios de corte de proteasas).

2. DESARROLLO DE LAS MATRICES CROMATOGRÁFICAS DE AFINIDAD:

Formulación, desarrollo y optimización de las diferentes matrices de afinidad, sean estas de origen bacteriano o matrices químicamente definidas con afinidad por SLAP, para su

uso en formato batch o columnas cromatográficas apuntando también a diferentes escalas de producción y segmentos de mercado.

- 2A-** Matriz cromatográfica derivada de bacterias enteras fijadas (matriz ensayada para la prueba de concepto).
- 2B-** Matriz cromatográfica derivada de bacterias enteras fijadas e inmovilizadas sobre diversos soportes cromatográficos.
- 2C-** Evaluación de otros materiales cromatográficos como la quitina o quitosano que sustituyan la matriz bacteriana.
- 2D-** Evaluación de las características catiónicas del dominio SLAP como segunda opción para la purificación o enriquecimiento de proteínas unidas a SLAP por cromatografía de intercambio catiónico complementaria a la cromatografía de afinidad.

Las matrices **2A** y **2B**, de muy bajo costo de producción, serán orientadas a su aplicación en laboratorios de investigación y alimentos, segmentos de menor exigencias regulatorias, mientras que **2C** refiere a matrices que por ser químicamente definidas permiten orientarse al segmento de aplicaciones diagnósticas y otras donde los requerimientos regulatorios son mayores.

3. DESARROLLO DE HERRAMIENTAS AUXILIARES PARA LA GENERACIÓN DE UN KIT COMPLETO DE PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS:

Desarrollo de las herramientas auxiliares para el sistema de purificación de proteínas desarrollado en este proyecto.

- 3A-** Construcción de una proteasa sitio específica derivada del virus Rhinovirus 3C fusionada a la etiqueta SLAP. Evaluación de la eficiencia de corte de la proteasa sobre las proteínas de fusión tanto en solución o en columna como mecanismo de elución de la proteína recombinante de la resina.

3B- Desarrollo de anticuerpos policlonales, monoclonales y nanobodies específicos para el SLAP_{TAG} para la detección de las proteínas recombinantes.

3C- Ensamblado de todos los elementos del kit optimizado, para la purificación de proteínas recombinantes. Establecimiento de protocolos estandarizados para las condiciones de pegado, elución, estabilidad de la matriz.

RESULTADOS

CAPÍTULO I: BIO-MATRIX

PUESTA A PUNTO DE LA MATRIZ

En el Laboratorio hemos estudiado y desarrollado un método de delivery o transporte de antígenos recombinantes utilizando *Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis* como plataforma vacunal[106]. Como se mencionó, *B. subtilis* tiene la ventaja de carecer de capa S propia, por lo que no es necesario decapar previamente a esta bacteria como ocurre con *L. acidophilus* para poder utilizarla como matriz. Además, *B. subtilis* siendo una bacteria aeróbica es más fácil de cultivar que *Lactobacillus* que es anaerobio facultativo. Además, el medio de cultivo para *B. subtilis* es de bajo costo lo que es importante para un eventual uso comercial. Con eso en mente, se generó una matriz biológica o Bio-Matrix (BM), que consiste en un cultivo bacteriano fijado según protocolo detallado en Materiales y Métodos.

Para poder hacer posteriores determinaciones, se relacionó la densidad óptica del cultivo de *B. subtilis* con su peso seco, relación lineal que se observa en la figura 14. Se obtuvo la relación siguiente: $Y = 0,0001661 * X$, donde Y es masa seca de Bio-Matrix (g) y X es densidad óptica a 600nm. El R^2 de la relación lineal resulto ser 0,9891.

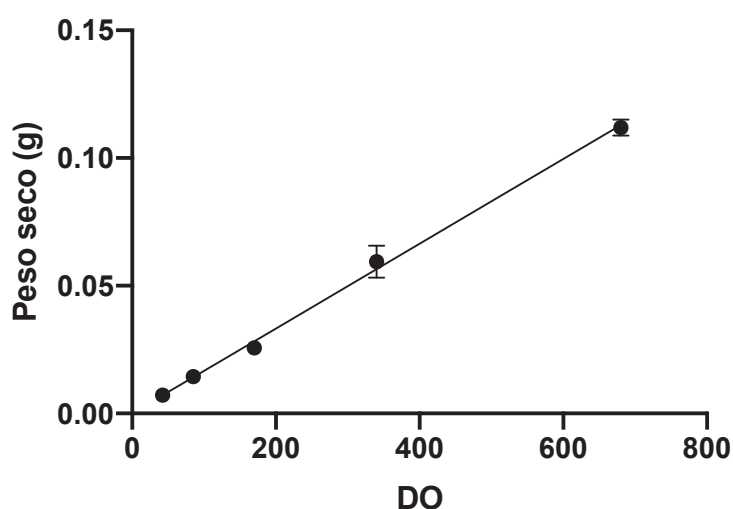


Fig. 14: Relación entre peso seco de la Bio-Matrix y la densidad óptica del cultivo de *B. subtilis*.

PUESTA A PUNTO DE LA PROTEÍNA MODELO

El SLAP_{TAG} se fusionó en fase con el carboxi-terminal de la proteína verde fluorescente (GFP) para generar una proteína reportera, la proteína (H₆)-GFP-SLAP_{TAG}, que permitirá simplificar futuros ensayos ya que facilita el seguimiento y la cuantificación proteica mediante medición de fluorescencia. Debido a que SlpA de *Lactobacillus* (y por tanto el SLAP_{TAG}) no se encuentra cristalizada, resultó de interés modelar la proteína de fusión, así como analizar el modelado con AlphaFold 2. El modelo predicho se muestra en la Fig. 15.

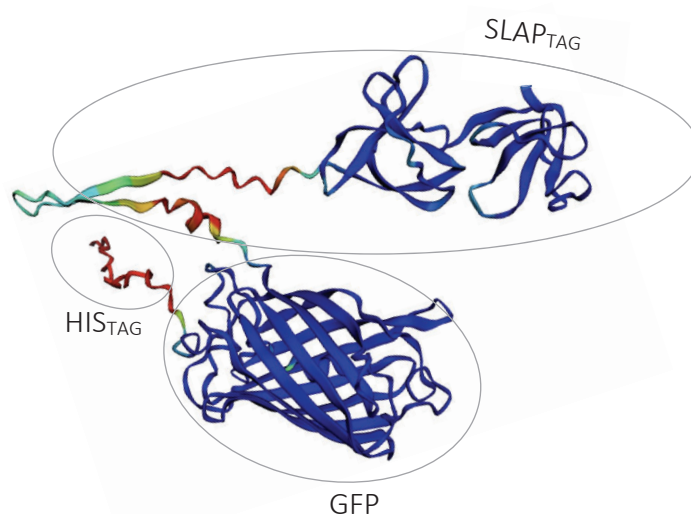


Fig. 15: Modelo AlphaFold2 de la proteína de fusión (H₆)-GFP-SLAP_{TAG}. La estructura predicha de AlphaFold2 fue coloreada automáticamente por la medida de confianza pLDDT. La alta precisión se encuentra coloreada en azul, mientras que la baja precisión en rojo. A pesar de que SLAP_{TAG} no se ha cristalizado, la predicción de la estructura presentó una alta precisión.

La estructura predicha por AlphaFold obtuvo una buena cobertura de secuencia (Fig.16) y fue analizada automáticamente según pLDDT (IDDT-C_α predicho por posición), una medida de confianza local por residuo en una escala de 0 a 100, como se muestra en la figura 17. La predicción colorea las regiones de alta confianza en azul, mientras que las de baja confianza son coloreadas en rojo. Las regiones conectoras y el HIS_{TAG}, que son regiones flexibles o desordenadas, mostraron una baja confianza en la predicción de estructura, como es de esperar. Puede apreciarse que la estructura de las regiones

correspondientes al barril beta de GFP y los dos dominios globulares correspondientes a SLAP_{TAG} se predijeron con alta confianza, coloreándose en azul.

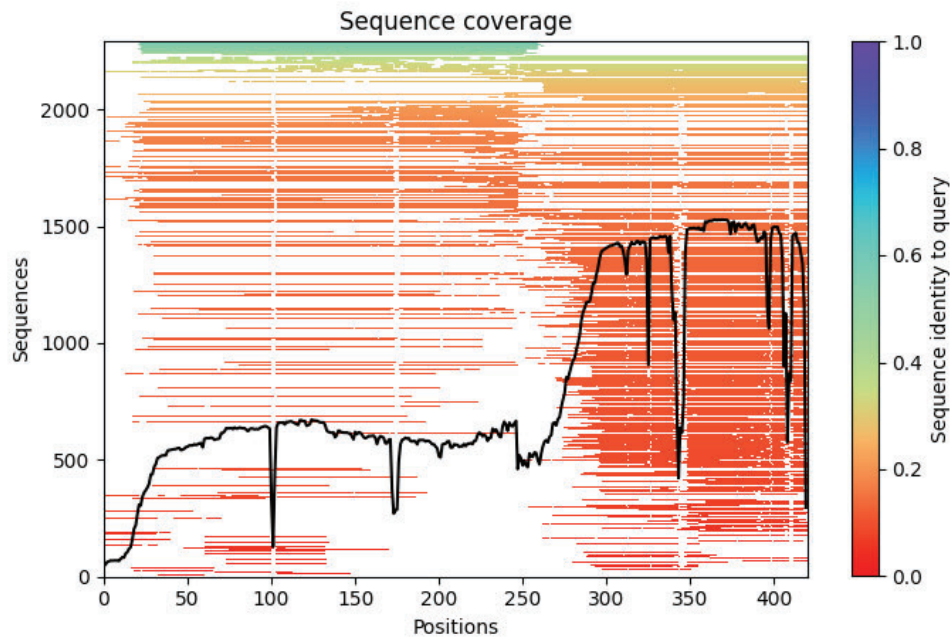


Fig. 16: Representación de la alineación de secuencia múltiple (MSA). Se muestra una buena cobertura a lo largo de toda la secuencia.

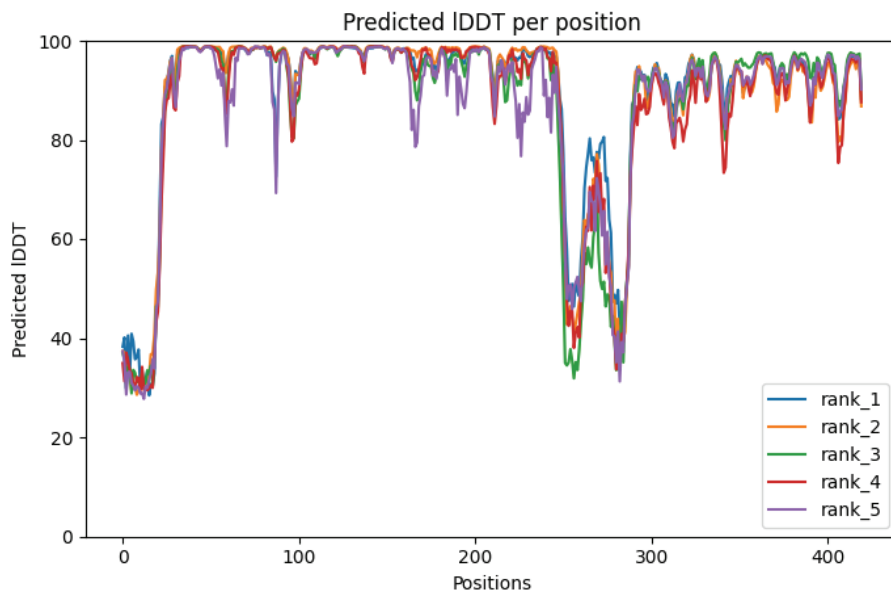


Fig. 17: Gráfico del pLDDT por posición para los cinco modelos predichos por AlphFold2. Los scores más altos se corresponden con las zonas de alta confianza coloreadas en azul en el modelo, mientras que las de menor confianza son las que fueron coloreadas en rojo.

La correcta predicción de los dominios puede verse también en la figura 18, donde se predice el error de posición entre residuos respecto a una estructura predicha. Puede observarse una confianza alta en la predicción de dominios, con valores de PAE menores a 5 Å (coloreado en azul), para los cinco modelos propuestos por AlphaFold2.

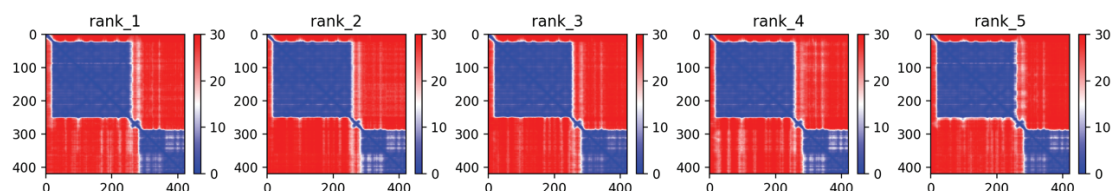


Fig. 18: Heatmap del error de alineación predicho (PAE) para los 5 modelos de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} realizados por AlphaFold2. Se puntúa el error de la posición de cada residuo con valores que oscilan entre 0 Å (azul) y 35 Å (rojo), donde los valores bajos indican mayor confianza. Se puede observar una alta confianza en los dominios de la construcción.

La proteína de fusión (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} se generó como herramienta para simplificar los futuros ensayos, independizándonos de la necesidad de realizar SDS-PAGE, puesto que permite una rápida cuantificación de proteína mediante medición de fluorescencia con filtros de excitación/emisión de 485/535 nm respectivamente. Es por ello que se realizó una curva de calibración con la proteína pura relacionando la fluorescencia de GFP con la masa proteica (Fig. 19). La misma permite predecir las concentraciones de proteína con simples mediciones de fluorescencia. Se corroboró que los extractos totales de proteína sin GFP no generan interferencia en la medición. Se obtuvo la relación siguiente: $F = 410304 * X$, donde F es fluorescencia y X es la masa (µg). El R² de la relación lineal resultó ser 0,9884. Se utilizaron estos datos para las subsiguientes estimaciones de masa de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG}.

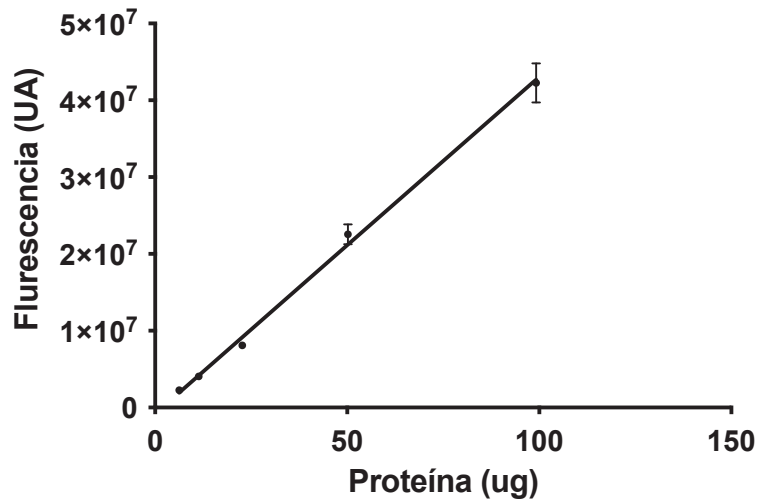


Fig. 19: Curva de calibración de la fluorescencia. El gráfico relaciona la fluorescencia (UA) de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} con la masa de proteína (μg).

PEGADO

Inicialmente se evaluaron las condiciones de adhesión de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} a la Bio-Matrix. Para ello se consideraron diferentes temperaturas y tiempos de incubación. En todos los casos la Bio-Matrix se incubó con proteína en exceso para asegurar el mayor pegado.

Como puede observarse en la fig. 20 se evaluó el pegado a 4, 24, 30 y 37°C, observándose diferencias significativas en el rendimiento cuando el pegado se realizaba a 4°C.

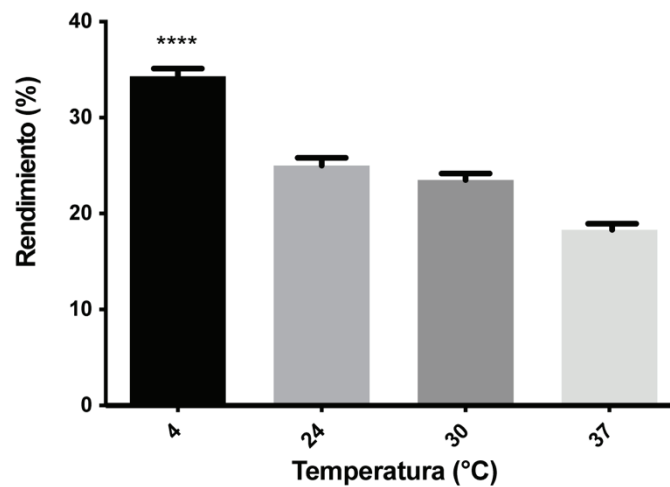


Fig. 20: Caracterización de la unión de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} a la Bio-matrix. La figura compara el rendimiento de purificación de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} de la cromatografía de afinidad basada en SLAP_{TAG} para diferentes temperaturas del proceso de unión. Los asteriscos denotan diferencia significativa utilizando el método ANOVA, prueba de Bonferroni (**** p < 0,0001).

Asimismo, se evaluó el pegado tras incubaciones de 5, 30 y 60 minutos, como se muestra en la fig. 21, observándose que el pegado no mejoraba significativamente al prolongar la incubación. Por ello, se concluyó que el pegado óptimo se realiza a 4°C en tan solo 5 minutos.

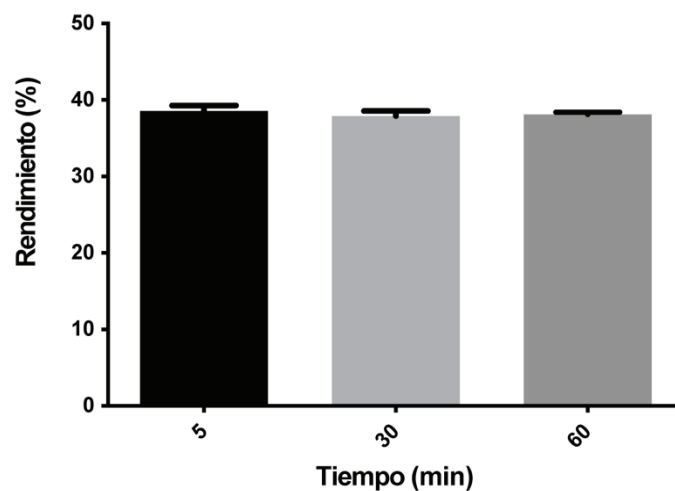


Fig. 21: Caracterización de la unión de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} a la Bio-matrix. La figura compara el rendimiento de purificación de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} de la cromatografía de afinidad basada en SLAP_{TAG} para diferentes tiempos de incubación en el proceso de unión a 4 °C. No se observan diferencias estadísticamente significativas.

Para profundizar en el conocimiento acerca de la interacción entre (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} y la Bio-Matrix, se realizaron isotermas de adsorción a Bio-Matrix constante. Las isotermas de adsorción indican cómo se distribuyen las moléculas adsorbidas sobre un adsorbente en un proceso de adsorción en equilibrio. Su ajuste según el modelo de Langmuir permite calcular parámetros de afinidad [122]. Como se muestra en la Fig. 22, la constante de disociación (KD) aparente se estimó en 4,3 μM. La capacidad máxima de adsorción (Bmax) se estimó en 1.152 mmol de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} por litro de Bio-Matrix. En otras palabras, 53,9 g de proteína por litro de Bio-Matrix, lo que significa 1,53 g de proteína/g de Bio-Matrix seca.

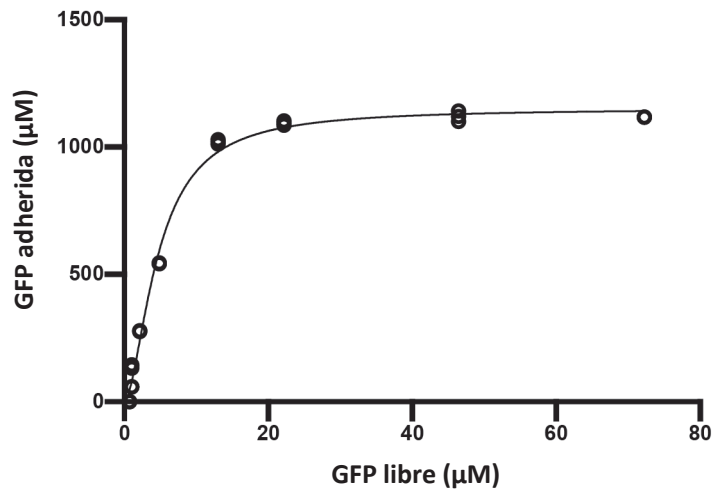


Fig. 22: Isoterma de adsorción de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} sobre Bio-Matrix.

ELUCIÓN

A continuación, se estudiaron las condiciones óptimas de elución de la proteína (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} asociada a la BM. El dominio SLAP_{TAG} contiene la región proteica responsable de la adhesión de la proteína SlpA a la membrana de *Lactobacillus acidophilus*. Se ha demostrado que SlpA de *L. acidophilus* tiene la capacidad natural de autoensamblarse en la superficie bacteriana para construir una capa proteica llamada capa S, una estructura de pared altamente ordenada que funciona como una barrera protectora contra los bacteriófagos, la resistencia a pH bajo y proteasas, y la adhesión bacteriana [108]. Está bien caracterizado que la remoción de la capa S se puede realizar de manera eficiente mediante la adición de agentes caotrópicos como LiCl, un compuesto que rompe los puentes de hidrógeno y conduce a una desnaturalización parcial de las proteínas y el consiguiente desprendimiento de la capa S [108]. Así, inicialmente, para estudiar las condiciones de elución para (H₆)-GFP-SLAP_{TAG}, se seleccionó la solución 5M LiCl. Una elución de la proteína (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} asociada a la BM se puede lograr con alta eficiencia con una solución LiCl 5M. Como se mencionó anteriormente, las soluciones de litio tienen un cierto efecto perjudicial sobre las proteínas, un efecto no deseado al adaptar el SLAP_{TAG} para la purificación de proteínas, especialmente para la purificación

de enzimas. Por lo tanto, se exploraron diferentes alternativas más suaves de buffers de elución para eluir eficientemente la proteína retenida en condiciones que preservan la estructura de la proteína y, por lo tanto, su función (Fig. 23).

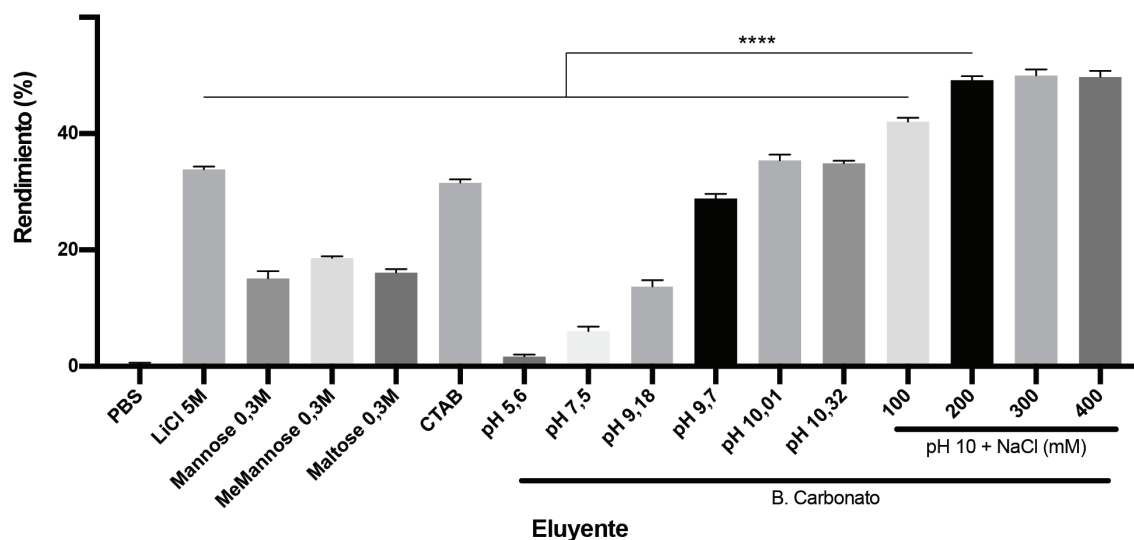


Fig. 23: Caracterización de la elución de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG}. La figura compara el rendimiento de purificación de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} del sistema de cromatografía de afinidad basado en SLAP_{TAG} para diferentes eluyentes. Los asteriscos denotan diferencia significativa utilizando el método ANOVA, prueba de Bonferroni (**** p < 0,0001).

En estudios anteriores se exploró la actividad de lectina de la proteína SlpA y se analizó su afinidad por diferentes glicoproteínas y polisacáridos, reportándose que SlpA tiene afinidad por la mucina de estómago porcino tipo III (PSM) [111]. Luego, para caracterizar con más detalle dicha afinidad, se realizaron ensayos de competición utilizando glicoestructuras demostrando que la D-manosa y D-maltosa en concentraciones superiores a 0,15 M son capaces de desplazar a SlpA parcialmente de la PSM.

Considerando lo reportado, probamos una serie de azúcares (monosacáridos y disacáridos) para la elución del SLAP_{TAG} observándose una eficiencia de elución menos eficiente en comparación con el protocolo de elución con 5M LiCl (Fig. 23).

A continuación, atendiendo a la naturaleza catiónica del SLAP_{TAG} a pH neutro y el papel de esta carga positiva en la interacción de SLAP_{TAG} con el ácido teicoico presente en la pared bacteriana, se evaluó la elución con un conjunto de compuestos catiónicos. Así,

encontramos que el detergente catiónico CTAB era capaz de eluir a (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} de la Bio-Matrix. Como se muestra en la Fig. 23, 0.3M de CTAB fue capaz de eluir (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} con una eficiencia similar a las soluciones de cloruro de litio. Aunque CTAB fue muy eficiente para el paso de elución, su eliminación posterior por procesos de diálisis no fue factible. Asimismo, teniendo en cuenta que SLAP_{TAG} tiene un valor teórico de punto isoeléctrico (pI) de 9.92, exploramos si la modificación del pH podría funcionar como un método de elución. Inicialmente se probaron cuatros puntos en un amplio rango de pH para evaluar si a pH ácidos o alcalinos se favorecía la elución (Fig. 24).

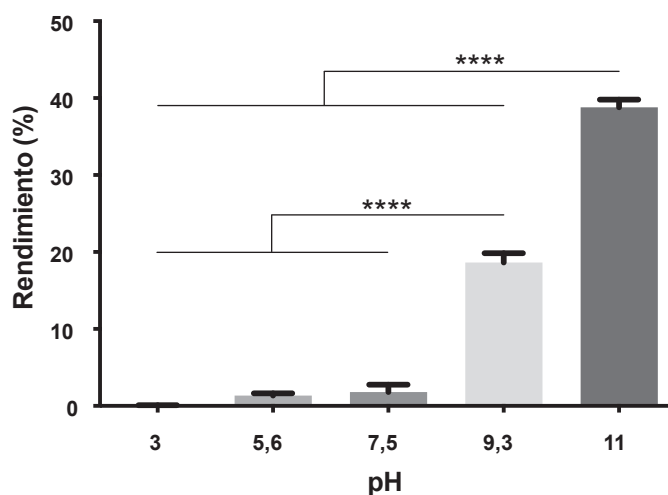


Fig. 24: Caracterización de la elución de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG}. La figura compara el rendimiento de purificación de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} del sistema de cromatografía de afinidad basado en SLAP_{TAG} para diferentes pH. Los asteriscos denotan diferencia significativa utilizando el método ANOVA, prueba de Bonferroni (**** p < 0,0001).

Como se muestra en la Fig. 24 se observó que en pH superiores a 9 la proteína (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} eluía y se obtenían los mayores rendimientos. Por ello se exploró qué sucedía en un rango más acotado de pH, aumentando la cantidad de puntos medidos en pH alcalino. Como se muestra en la Fig. 23 cuando el pH del buffer de bicarbonato estaba cerca del punto isoeléctrico (pI) teórico de SLAP_{TAG}, se mejoraba el rendimiento de elución de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} consecuentemente. De igual modo, después de establecer el buffer de bicarbonato a pH 10 como un buffer de elución, exploramos si la adición de NaCl podía mejorar el proceso de elución. Como se muestra en la Fig. 23, la adición de 200 mM de

NaCl fue capaz de aumentar significativamente la cantidad recuperada de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} en el eluído. Por tanto, se estableció como buffer óptimo para la elución en buffer carbonato pH 10, 200 mM NaCl.

Con el buffer de elución optimizado, se procedió a evaluar el tiempo y la temperatura de elución. Como puede observarse en la Fig. 25 se evaluó la elución a 4, 24, 30 y 37°C, observándose diferencias significativas en el rendimiento cuando la elución se realizaba a 24°C.

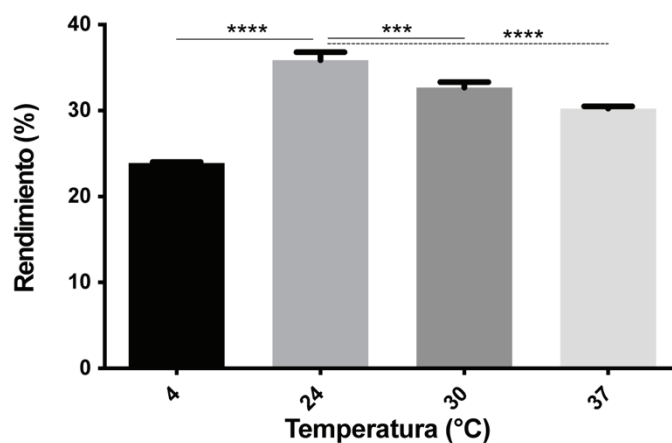


Fig. 25: Caracterización de la temperatura de elución. La figura compara el rendimiento de purificación (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} de la cromatografía de afinidad basada en SLAP_{TAG} para diferentes temperaturas de elución. Los asteriscos denotan diferencia significativa utilizando el método ANOVA, prueba de Bonferroni (***) p = 0,0003; **** p < 0,0001).

Asimismo, se evaluó la elución tras incubaciones de 5, 30 y 60 minutos, como se muestra en la Fig. 26, observándose que la elución no mejoraba significativamente al prolongar la incubación. Por tanto, se estableció que las mejores condiciones de elución son a temperatura ambiente en 5 minutos.

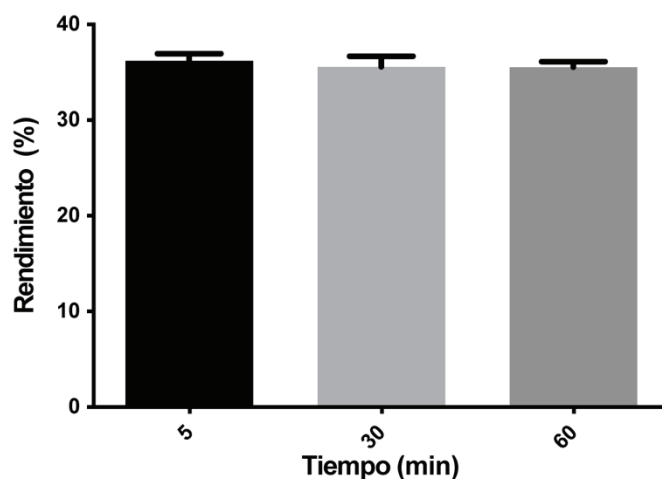


Fig. 26: Caracterización del tiempo de elución (H₆)-GFP-SLAP_{TAG}. La figura compara el rendimiento de purificación de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} de la cromatografía de afinidad basada en SLAP_{TAG} para diferentes tiempos de incubación de elución. Ensayo realizado a temperatura ambiente. No se observan diferencias estadísticamente significativas.

ESTABILIDAD EN EL TIEMPO Y REUSO

Como se describe en Materiales y Métodos, se produjo un lote de la matriz bacteriana y se congelaron varias alícuotas a -20°C para estudiar su estabilidad a lo largo del tiempo. En diferentes momentos se descongelaron algunas alícuotas y se evaluó la purificación de la proteína reportera (H₆)-GFP-SLAP_{TAG}. Como se muestra en la Fig. 27, el rendimiento de purificación se mantuvo estable durante más de un año.

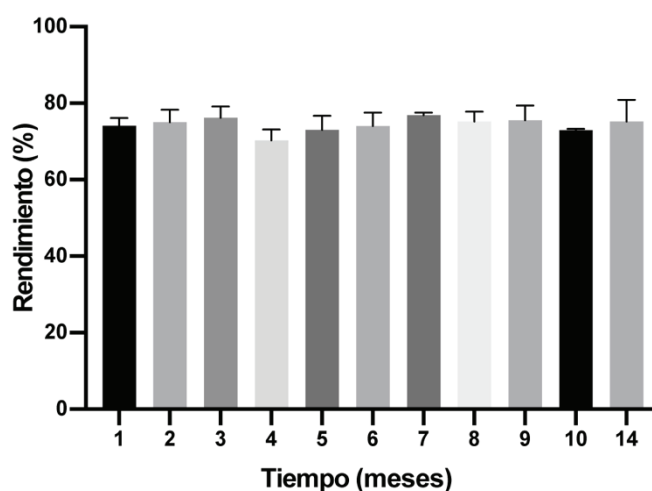


Fig. 27: Análisis de estabilidad a lo largo del tiempo y reutilización de la Bio-Matrix. La figura compara el rendimiento de purificación de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} mediante cromatografía de afinidad basada en SLAP_{TAG} a diferentes tiempos cuando se conserva a -20°C. No se observan diferencias significativas.

Además, se evaluó la capacidad de reutilización de la Bio-Matrix. Para ello, una misma alícuota de BM se utilizó para purificar la proteína reportera (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} repetidas veces. Se determinó que la matriz bacteriana puede ser reutilizada cinco veces sin modificación en el rendimiento de purificación de proteínas (Fig. 28).

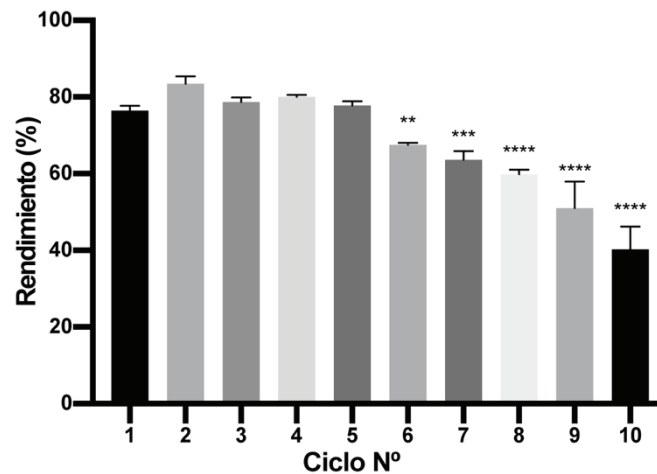


Fig. 28: Análisis de la reutilización de la Bio-Matrix. La figura compara el rendimiento de purificación de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} mediante la cromatografía de afinidad basada en SLAP_{TAG} para diferentes ciclos de reutilización de la Bio-Matrix. El asterisco denota diferencia significativa utilizando el método ANOVA, prueba de Bonferroni (** p = 0,0059; *** p = 0,0002; **** p < 0.0001).

PROTOCOLO FINAL

Con toda la información experimental obtenida se estableció un protocolo para la purificación de proteínas marcadas con SLAP_{TAG}, como se muestra en la Fig. 29. Según

lo estudiado anteriormente, las condiciones óptimas de pegado fueron establecidas como se detalla:

- 5 minutos
- 4 °C
- Buffer A: 200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5

Los lavados se realizan con el mismo buffer de pegado. Las condiciones de elución óptimas fueron las siguientes:

- 5 minutos
- 24 °C (temperatura ambiente)
- Buffer B: buffer Bicarbonato pH 10, 200 mM NaCl

Es para destacar que todo el proceso de purificación se puede completar en 15 minutos, ya que otros procedimientos de purificación en batch se llevan adelante en al menos 1 hora (por ejemplo, IMAC según instrucciones del comerciante).



Fig. 29: Protocolo optimizado para la purificación de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} utilizando Bio-Matrix. Descripción gráfica del protocolo de cromatografía de afinidad basado en SLAP_{TAG}. Creado con BioRender.com.

Para tener una visión directa de todo el proceso de purificación de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG}, incluida la unión y elución de la proteína reportera SLAP, la Bio-Matrix se fijó e inmovilizó en cubreobjetos en diferentes etapas del proceso de purificación para ser observado por microscopía confocal. En la Fig. 30 se puede observar la autofluorescencia nativa roja derivada de células fijadas de *Bacillus subtilis* natto que componen la BM (Fig. 30, canal "Rojo"). Se observa, asimismo, la fluorescencia verde correspondiente a la fluorescencia de la proteína (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} (Fig. 30, canal "Verde"). Es posible observar la adhesión de la proteína reportera (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} cubriendo completamente la superficie bacteriana (Fig. 30, canal "Superposición").

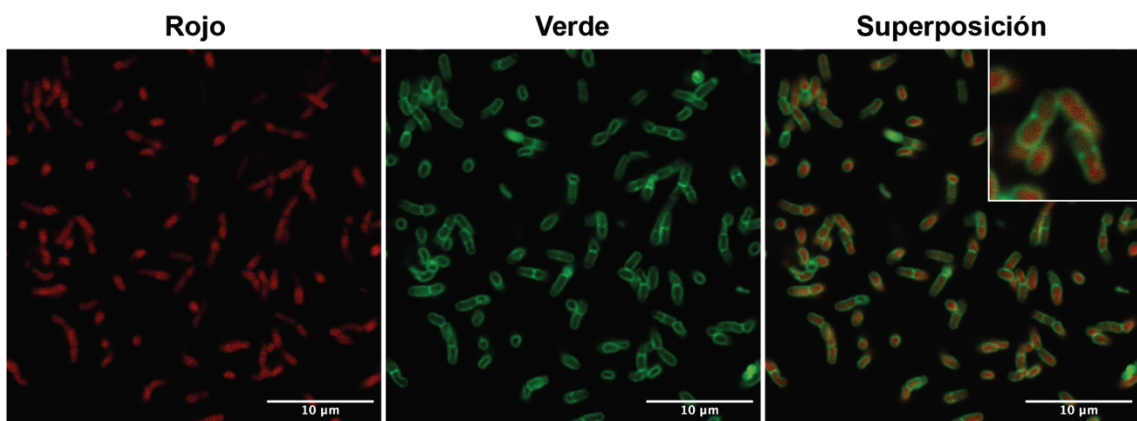


Fig. 30: Análisis por microscopía confocal de la Bio-Matrix en distintos momentos de la SAC. En el canal rojo se observa autofluorescencia nativa roja de *Bacillus subtilis*. En el canal verde se observa la fluorescencia correspondiente a la proteína (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} unida a la Bio-Matrix. Se puede observar cómo la GFP se visualiza únicamente en la superficie la Bio-Matrix.

Todo el proceso también puede ser monitoreado por observación directa bajo luz UV (Fig. 31), luz que permite detectar la presencia de GFP por observación directa de fluorescencia verde. En la figura 31 se puede observar cómo la fluorescencia de GFP

presente en el sobrenadante de expresión (Tubo IN), se recupera en la fracción de elución (Tubo E).

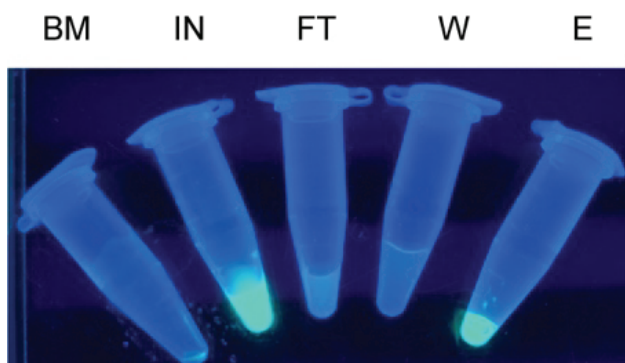


Fig. 31: Foto de tubos que contienen fracciones de purificación vistas bajo luz UV. La fluorescencia del Input correspondiente a GFP se recupera en el eluido. BM = Bio-Matrix; IN = Input; FT = percolado; W = lavado; E = elución.

ESCALADO

Se procedió a escalar el sistema aumentando los volúmenes para la purificación de sobrenadantes de expresión provenientes de cultivos de 200 mL. Con los sobrenadantes de expresión en *E. coli* de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} se calcularon los rendimientos y eficiencia de purificación para el protocolo optimizado de SAC (Tabla 5).

Paso	Vol. (ml)	Proteína total (mg)	Actividad total (AUF)	Actividad específica (AUF/mg)	Factor de purificación	Rendimiento (%)	Eficiencia
Extracto crudo	10	591	3,75 x10 ¹¹	6,34 x10 ⁸	1	100	-
Bio-Matrix	1	5,96 ± 0,30	2,96x10 ¹¹ ± 1,57 x10 ¹⁰	4,96 x10 ¹⁰ ± 2,92 x10 ⁹	78,23 ± 4,61	78,90 ± 4,20	61,81 ± 6,33

Tabla 5: Tabla de purificación de GFP-SLAP_{TAG} mediante SAC.

En este caso se ajustaron las cantidades de Bio-Matrix para que la proteína etiquetada quedara retenida o percolara poco. Para ello se tuvo en cuenta la capacidad máxima de la Bio-Matrix calculada mediante la isoterma de adsorción.

Se observó que con el protocolo optimizado de SAC se pudo purificar (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} con un rendimiento elevado de casi el 80%, como se muestra en la tabla 5, pudiendo visualizarse una banda única mediante SDS-PAGE (Fig. 32).

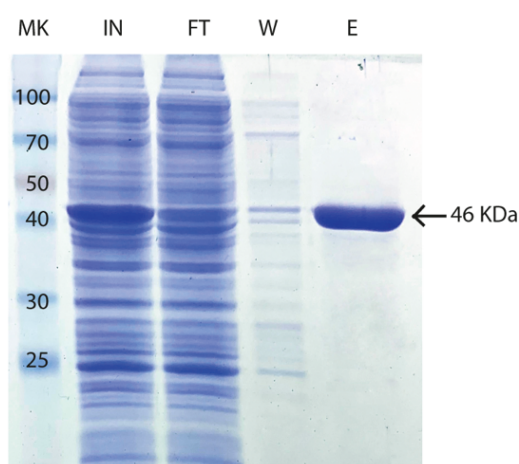


Fig. 32: Análisis del escalado en la purificación de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} utilizando SAC. SDS-PAGE con tinción de Coomassie Blue de la purificación a escala de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG}. BM = Bio-Matrix; MK = marcador proteico (kDa); IN = Input; FT = percolado; W = lavado; E = elución.

COMPARACIÓN CON IMAC

Una vez optimizado el protocolo experimental de cromatografía basada en SLAP_{TAG}, comparamos su eficiencia con la resina de agarosa Ni-NTA Superflow, una matriz de agarosa cargada con Ni²⁺ de alto rendimiento (IMAC), utilizando la proteína reportera (H₆)-GFP-SLAP_{TAG}. La comparación la realizamos debido a que, como se mencionó en la

Introducción, His_{TAG} es la etiqueta molecular más utilizada en la purificación de proteínas recombinantes.

Como se describe en Materiales y Métodos, un lisado bacteriano sobre-expresando (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} se dividió en partes iguales en dos fracciones con las que se realizaron ambos protocolos de purificación (Fig. 33), SAC e IMAC. Como se muestra en la Tabla 5, el protocolo optimizado de SAC fue capaz de purificar (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} con alta eficiencia (tabla 5 y Fig. 32) y con un rendimiento similar al obtenido mediante IMAC con la etiqueta comercial de polihistidinas mediante el protocolo provisto por la empresa (Fig. 33, Fig. 34).

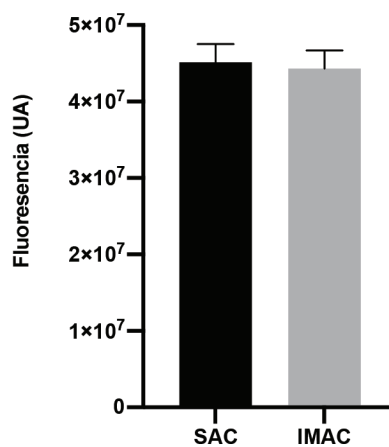


Fig. 33: Comparación de la purificación de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} utilizando la Bio-Matrix respecto a la purificación con la matriz comercial de agarosa de alto rendimiento cargada con Ni²⁺. La cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC) y el sistema de cromatografía de afinidad basado en SLAP_{TAG} se comparan en su capacidad para purificar (H₆)-GFP-SLAP_{TAG}. Se muestra la fluorescencia relativa del total de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} recuperado en la fracción de elución.

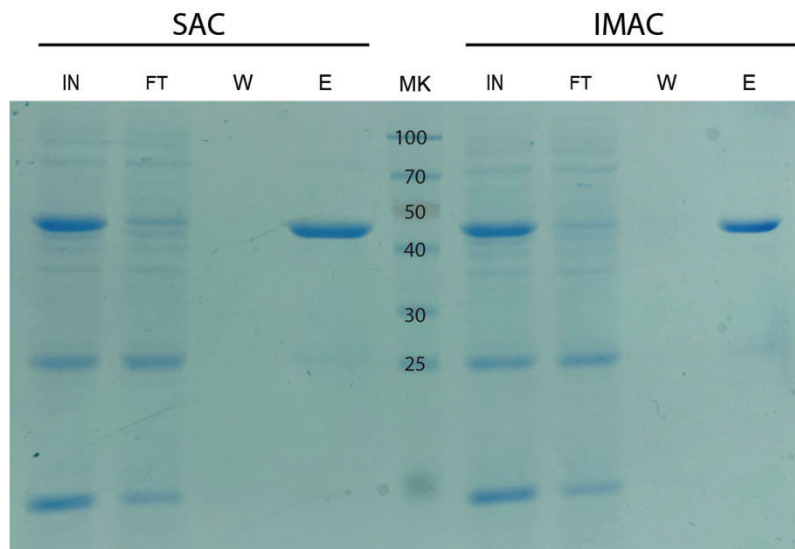


Fig. 34: Comparación de la purificación de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} utilizando la Bio-Matrix respecto a la purificación con la matriz comercial de agarosa de alto rendimiento cargada con Ni²⁺. La cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC) y el sistema de cromatografía de afinidad basado en SLAP_{TAG} se comparan en su capacidad para purificar (H₆)-GFP-SLAP_{TAG}. Se muestra un SDS-PAGE con tinción de Coomassie Blue con las diferentes fracciones de purificación de cada sistema cromatográfico. MK = marcador proteico (KDa); IN = Input; FT = percolado; W = lavado; E = elución.

UNIVERSALIDAD DEL SISTEMA

Para evaluar si SLAP_{TAG} se puede adaptar como un sistema universal de purificación de proteínas, se seleccionó un conjunto de las diferentes proteínas. Como se muestra en la Fig. 35, todas las proteínas recombinantes se construyeron como una fusión con la etiqueta SLAP_{TAG}. Así, la proteína bacteriófaga (T7-lisozima), las proteínas virales humanas (la proteasa 3C del rinovirus humano -SLAPase- y SPIKE de SARS-CoV2), las proteínas bacterianas (Omp19 de *B. abortus*, flagelina de *Salmonella*, EspA, Intimin y Tir -EITH7- de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga), la proteína eucariótica (Galectina-8 de ratón) y diferentes etiquetas moleculares comerciales (GST, MBP y GFP) fueron fusionadas a la etiqueta SLAP_{TAG}.

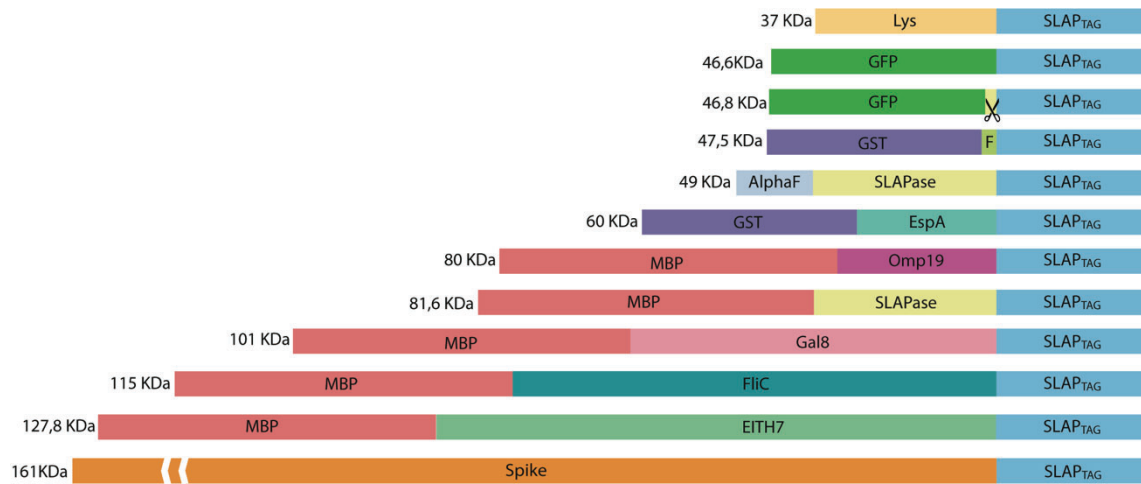


Fig. 35: Representación de la estructura de proteínas recombinantes etiquetadas con SLAP. Lys = lisozima del bacteriófago T4; GFP = proteína fluorescente verde de *Aequorea victoria*; GST = glutatión-s-transferasa; HRV-3c = proteasa 3c de rinovirus humano 3C; EspA = proteína EspA de *E. coli*; Omp19 = proteína Omp19 de *B. abortus*; MBP = proteína de unión a maltosa; Gal8 = galectina-8 de ratón; EITH7 = proteína de fusión EspA, Intimin y Tir de la *E. coli* productora de toxina Shiga; Spike = Proteína Spike de SARS-CoV2. La tijera indica el sitio de corte de la proteasa SLAP_{ASE}.

Como se muestra en la Fig. 36, se seleccionó un grupo de las proteínas de fusión construidas para la expresión bacteriana y su purificación se realizó de manera eficiente con la cromatografía de afinidad que desarrollamos. Se realizó, asimismo, un Western-Blot para confirmar la identidad proteica con anticuerpos policlonales anti-SLAP_{TAG} (Fig. 37). Comprobamos, de esta manera, que SAC es capaz de purificar proteínas recombinantes de diverso peso molecular cuando se expresan en *E. coli*. Asimismo, se verificó la capacidad de los anticuerpos anti-SLAP_{TAG} generados de reconocer la etiqueta fusionada a diversas proteínas, con casi nulo reconocimiento no específico.

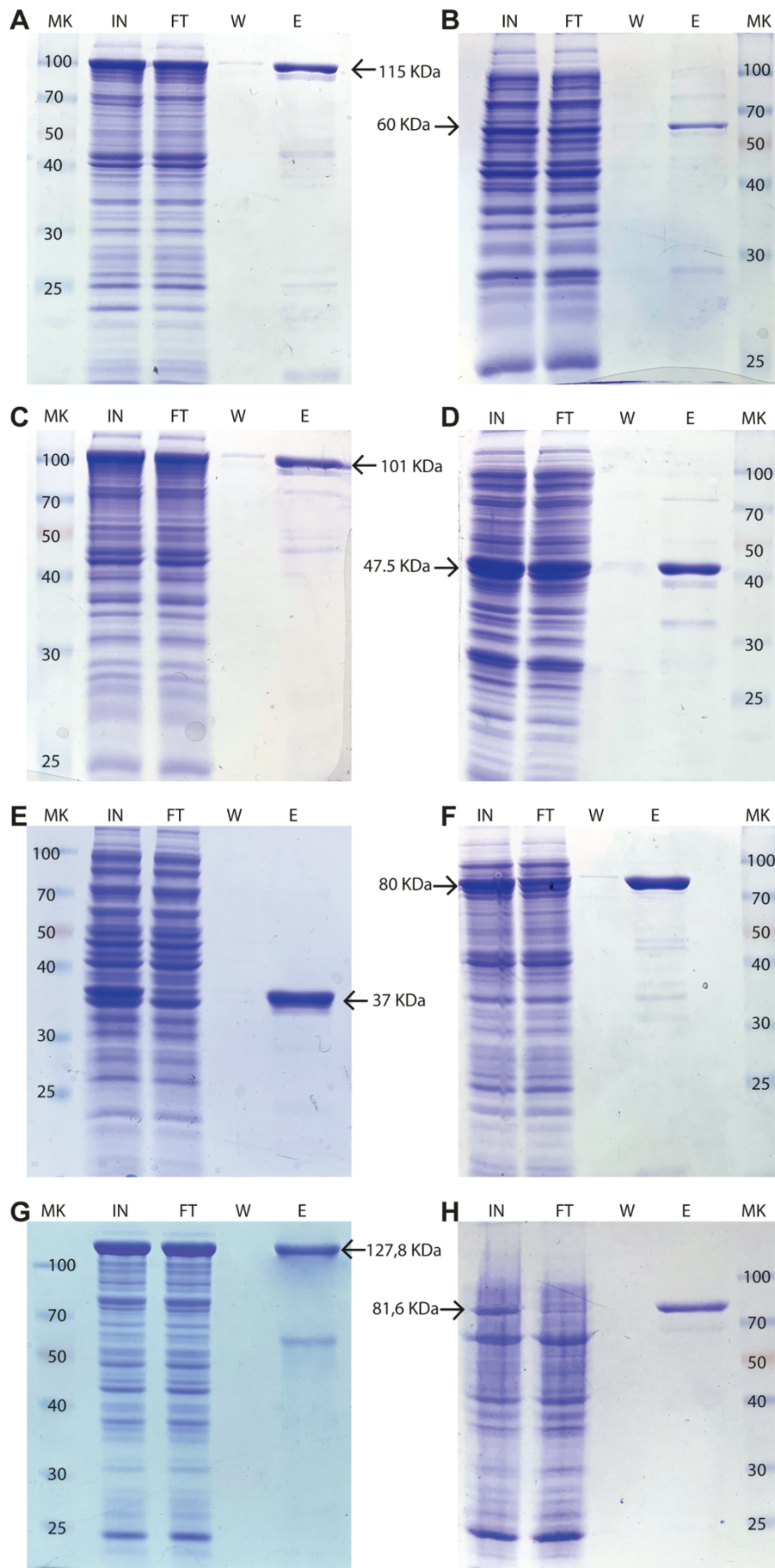


Fig. 36: Análisis de diferentes purificaciones de proteínas etiquetadas con SLAP_{TAG} expresadas en *E. coli*. SDS-PAGE teñido con Coomassie Blue de fracciones de purificación de cromatografía de afinidad basada en SLAP_{TAG} para (A) FliC-SLAP_{TAG} (B) EspA-SLAP_{TAG} (C) Gal8-SLAP_{TAG} (D) GST-SLAP_{TAG} (E) Lys-SLAP_{TAG} (F) Omp19-SLAP_{TAG} (G) EITH7-SLAP_{TAG} (H) SLAP_{ASE} (proteasa 3c de Rinovirus humano fusionada a SLAP_{TAG}). MK = marcador proteico (KDa); IN = Input; FT = percolado; W = lavado; E = elución.

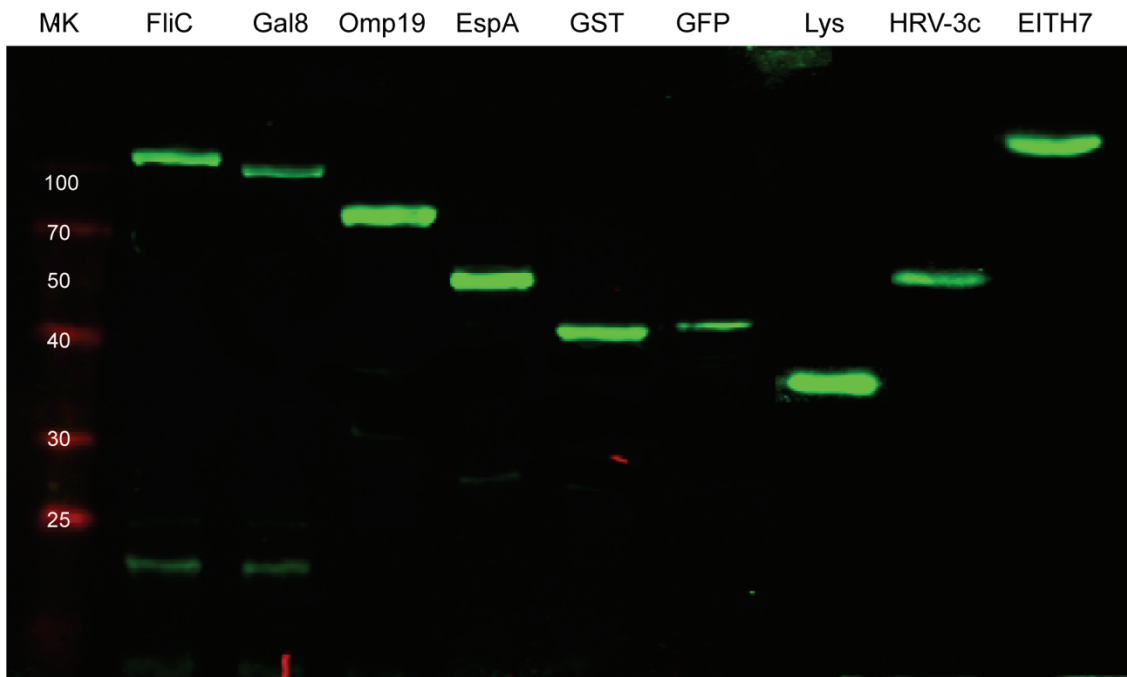


Fig. 37: Análisis de diferentes purificaciones de proteínas etiquetadas con SLAP_{TAG} expresadas en *E. coli*. Western Blot de fracciones de elución de purificación de diversas proteínas etiquetadas con SLAP_{TAG}, reveladas con anticuerpo policlonal anti SLAP_{TAG}. MK = marcador proteico (KDa)

Como se mencionó en la Introducción, la industria de las proteínas recombinantes hace uso de diversos sistemas de producción proteica. Por ello, además de la expresión bacteriana, se evaluaron diferentes sistemas de expresión de proteínas como levaduras o células de mamíferos (Fig. 38). Como se muestra en la Fig. 38, mientras que la proteasa HRV3C viral fusionada con el SLAP_{TAG}, llamada SLAP_{ASE}, se purificó de manera muy eficiente a partir del sobrenadante de *Pichia pastoris*, el SARS-CoV2 SPIKE fusionado con el SLAP_{TAG} se purificó a partir del sobrenadante de células HEK293 transfectadas. Estos

resultados confirmaron que el SLAP_{TAG} puede ser ampliamente adoptado para la purificación por cromatografía de afinidad independientemente del sistema de expresión.

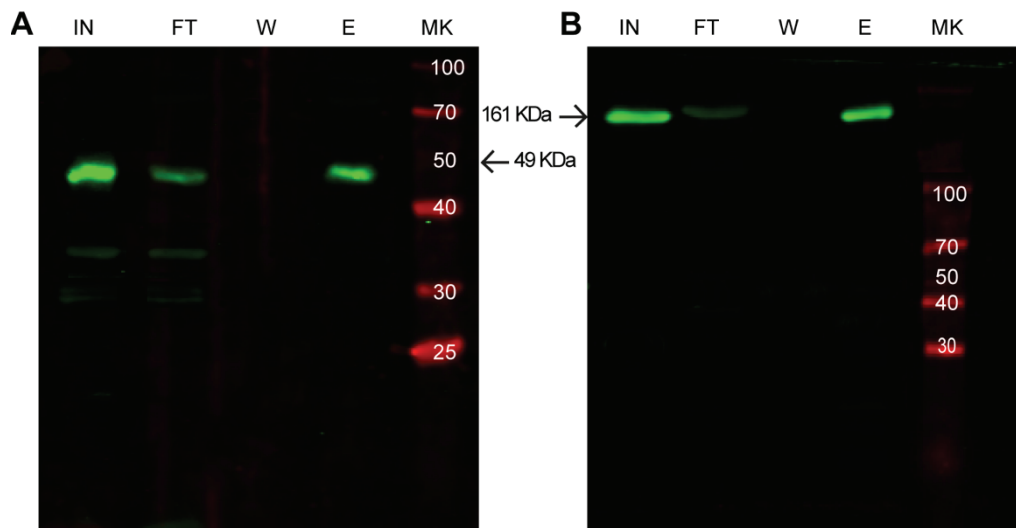


Fig. 38: Análisis por Western blot de purificación de proteínas etiquetadas con SLAP_{TAG} utilizando diferentes sistemas de expresión. (A) Purificación de SLAP_{ASE} (proteasa 3c de rinovirus humano fusionada a SLAP_{TAG}) expresada en *Pichia pastoris*. (B) Purificación de la proteína Spike de SARS CoV2 fusionada a SLAP_{TAG} expresada en células HEK293. MK = marcador proteico (kDa); IN = Input, sobrenadante de cultivo; FT = percolado; W = lavado; E = elución.

SOLUBILIDAD

Un problema importante en la producción de proteínas recombinantes es que su expresión puede conducir a la formación de agregados insolubles. Estos agregados, denominados cuerpos de inclusión (IB), están formados por polipéptidos desplegados o mal plegados. Esta dificultad es el cuello de botella de la expresión proteica en bacterias[123], [124]. Para solucionar este problema, las proteínas se pueden fusionar con etiquetas moleculares que mejoran la solubilidad de la proteína a la que se fusionan y permiten su correcto plegamiento. Ejemplos de estas etiquetas incluyen glutathion-S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa (MBP), proteína A de *Staphylococcus* (SpA), tiorredoxina A (Trx) y el pequeño modificador relacionado con

ubiquitina (SUMO). Las etiquetas GST y MBP no solo mejoran la solubilidad de sus socios de fusión, sino que también aumentan la eficiencia de la purificación de proteínas [53].

Para verificar si SLAP_{TAG} presentaba la ventaja de favorecer la solubilidad de la proteína compañera, se generaron vectores de expresión fusionando SLAP_{TAG} a la proteína Vp7 del virus de lengua azul y al toxoide de *Escherichia coli* productora de shiga toxina (Fig. 39), proteínas que forman cuerpos de inclusión. Asimismo, a modo de control, se generaron vectores de expresión fusionando His_{TAG} a Vp7 y al toxoide (Fig. 39).

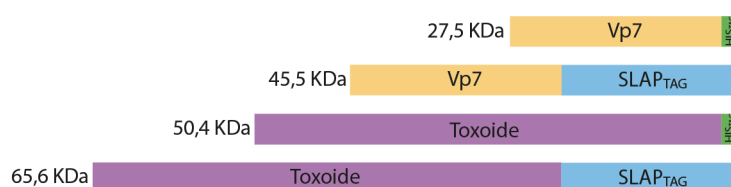


Fig. 39: Esquema de proteínas de fusión para evaluar mejora en la solubilidad. Se muestra la representación de las proteínas recombinantes generadas al fusionar Vp7 y Toxoide a His_{TAG} y SLAP_{TAG}. Se indican los pesos moleculares esperados.

Se evaluó la solubilidad y la formación de cuerpos de inclusión al expresar dichas construcciones en *Escherichia coli* mediante SDS-PAGE teñido con Coomassie Blue (Figs. 40 y 41) y por Western Blot (Figs. 42 y 43). Para favorecer la solubilidad, la expresión se realizó a 18°C durante 16 hs.

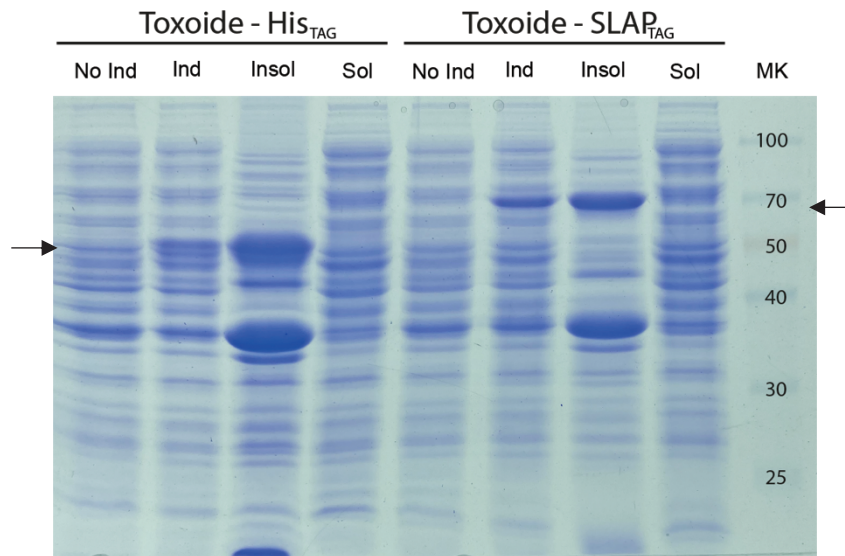


Fig. 40: Análisis por SDS-PAGE de la solubilidad del Toxoide de *E. coli*. Fracciones de expresión del Toxoide fusionado a His_{TAG} (izquierda) o SLAP_{TAG} (derecha). Toxoide-His_{TAG} tiene un tamaño de 50,4 KDa y Toxoide-SLAP_{TAG} de 65,6 KDa. Las flechas indican el tamaño de banda correspondiente. No Ind = no inducido; Ind = Inducido; Insol = fracción insoluble; Sol = fracción soluble; MK = marcador proteico (KDa).

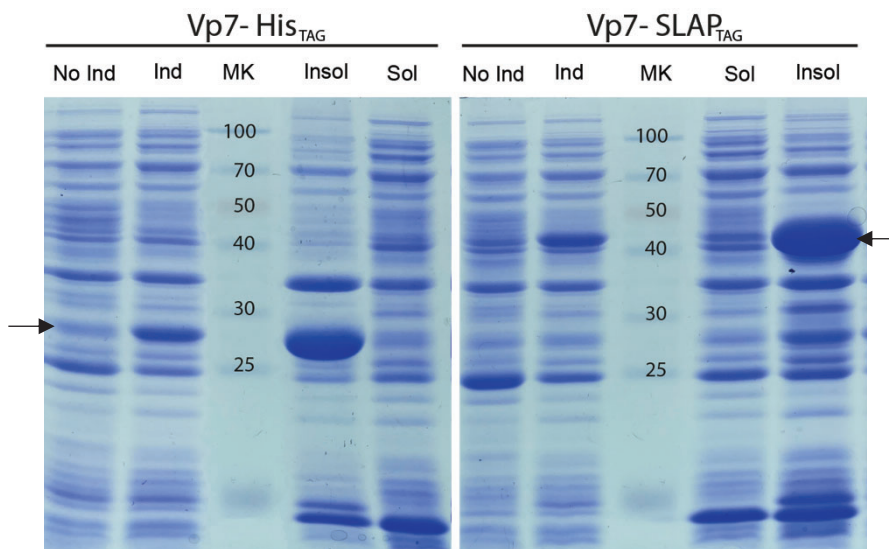


Fig. 41: Análisis por SDS-PAGE de la solubilidad de Vp7 de virus de lengua azul. Fracciones de expresión de la proteína Vp7 fusionada a His_{TAG} (izquierda) o SLAP_{TAG} (derecha). Vp7-His_{TAG} tiene un tamaño de 27,5 KDa y Vp7-SLAP_{TAG} de 45,5 KDa. Las flechas indican el tamaño de banda correspondiente. No Ind = no inducido; Ind = Inducido; Insol = fracción insoluble; Sol = fracción soluble; MK = marcador proteico (KDa).

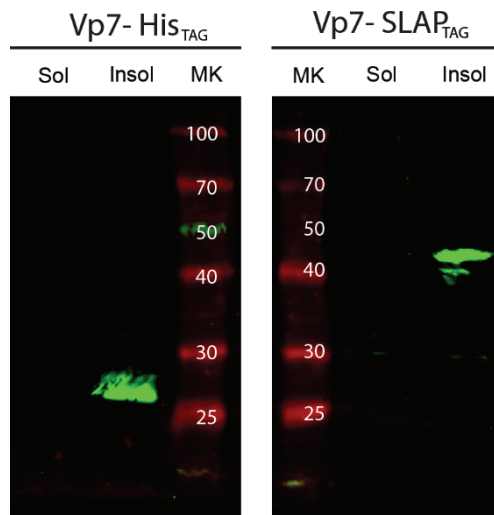


Fig. 42: Análisis por Western Blot de la solubilidad de Vp7 del virus de lengua azul. Fracciones de expresión de la proteína Vp7 fusionada a His_{TAG} (izquierda) o SLAP_{TAG} (derecha), reveladas con anticuerpos anti-His_{TAG} y anti-SLAP_{TAG} respectivamente. Insol = fracción insoluble; Sol = fracción soluble; MK = marcador proteico (kDa).

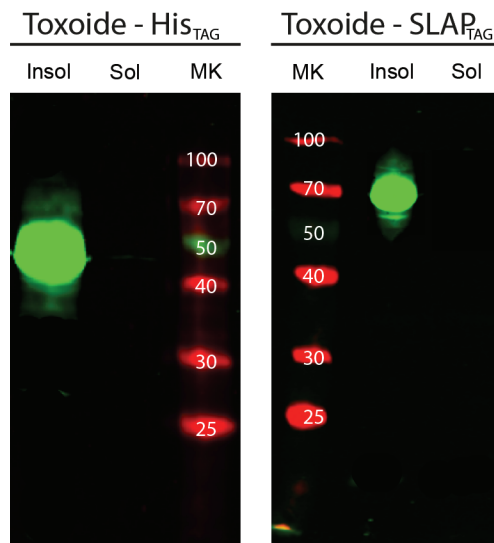


Fig. 43: Análisis por Western Blot de la solubilidad del Toxoide de *E. coli*. Fracciones de expresión del Toxoide fusionado a His_{TAG} (izquierda) o SLAP_{TAG} (derecha), reveladas con anticuerpos anti-His_{TAG} y anti-SLAP_{TAG} respectivamente. Insol = fracción insoluble; Sol = fracción soluble; MK = marcador proteico (kDa).

Como puede observarse en el panel izquierdo de las figuras 40-43 tanto Vp7 como el toxoide fusionado a His_{TAG} forman cuerpos de inclusión al ser expresadas en *E. coli*. En ambos casos, la proteína expresada queda en la fracción insoluble al estar fusionadas a

His_{TAG}. Asimismo, se observó que al ser fusionadas al SLAP_{TAG} (panel derecho de las figuras 40-43) las proteínas quedan en la fracción insoluble, sin mejoras observables en su solubilidad comparado con la fusión a His_{TAG}. Los resultados indican que SLAP_{TAG} no mejora la solubilidad de las proteínas Vp7 y toxoide, al menos en las condiciones de expresión evaluadas.

CONSERVACIÓN DEL CORRECTO PLEGAMIENTO PROTEICO

La proteína GFP ha sido ampliamente utilizada como marcador molecular fluorescente en varias aplicaciones de biología molecular y celular. Además de la naturaleza fluorescente, GFP y sus variantes (YFP, DSR, etc.) se destacan por su estabilidad química *in vitro* e *in vivo* [125]. Un uso interesante de estas proteínas fluorescentes ha sido como reportera del correcto plegado de proteína [126]. Se ha observado la disminución o desaparición de la señal de fluorescencia de GFP después de la desnaturalización inducida por ácido [127]. La GFP desnaturalizada con ácido se ha utilizado como sustrato en estudios de la actividad de plegamiento de algunas chaperonas bacterianas y otras moléculas similares a chaperonas, como son las peptidil-prolil cis/trans isomerasas (PPIasas: EC 5.2.1.8) [126]. Para poder ser utilizada como sustrato en dichos ensayos es necesario contar con la proteína GFP pura y correctamente plegada.

En nuestro grupo de investigación nos interesa el estudio de los mecanismos moleculares de patógenos microbianos y su interacción con sus hospedadores mamíferos, en particular *Brucella abortus* el agente causal de la brucelosis [128]–[130]. La brucelosis es una enfermedad zoonótica causada por *Brucella spp*, una bacteria gramnegativa intracelular que pertenece al grupo α -2 de *Proteobacteria*. Su virulencia se debe a su capacidad para adaptarse a un estilo de vida intracelular en células huésped [131]. Con el fin de entender mejor los mecanismos moleculares implicados en la virulencia y adaptación intracelular de *Brucella*, en nuestro laboratorio llevamos a cabo un análisis comparativo del proteoma utilizando dos tecnologías complementarias: gel 2D [129] y etiqueta isobárica iTraq [130]. Nuestros resultados indican que, después de la localización intracelular, *B. abortus* sobreexpresa dos PPIasas (BAB1_1117 y BAB1_1118) que

pertenecen a la familia de las ciclofilinas (COG0652), conocidas como CypB y CypA, respectivamente.

Las ciclofilinas son enzimas que pertenecen a la superfamilia de las PPIasas. Estas enzimas actúan como catalizadores biológicos acelerando los cambios conformacionales cis/trans o trans/cis en los enlaces Xaa-Pro que limitan la velocidad de plegamiento de proteínas en eucariotas y procariontes. La isomerización espontánea de los enlaces de peptidil-prolina es una reacción lenta y, en consecuencia, requiere la ayuda de PPIasas que aceleran este paso durante el plegamiento de proteínas[132].

Con el fin de estudiar si las proteínas fusionadas a SLAP_{TAG} conservan su estructura de plegamiento al ser fusionadas al SLAP_{TAG} y, simultáneamente caracterizar las ciclofilinas de *Brucella*, se purificó la proteína (H₆)-GFP-SLAP_{TAG}, y se ensayó su utilización como sustrato para la medición de la actividad PPIasa de CypA y CypB de *Brucella abortus*. La determinación enzimática se realizó con ciclofilinas recombinantes purificadas. Para confirmar la actividad de la PPIasa, se realizó una mutación puntual doble en CypB reemplazando dos aminoácidos que se sabe que son críticos para la actividad de la PPIasa (R59A y F64A; [133]). La proteína recombinante resultante CypB^{R59A/F64A} se expresó y purificó, y se utilizó en el ensayo de actividad PPIasa. Asimismo, como control, se midió la actividad PPIasa de cypB desnaturalizada por calor.

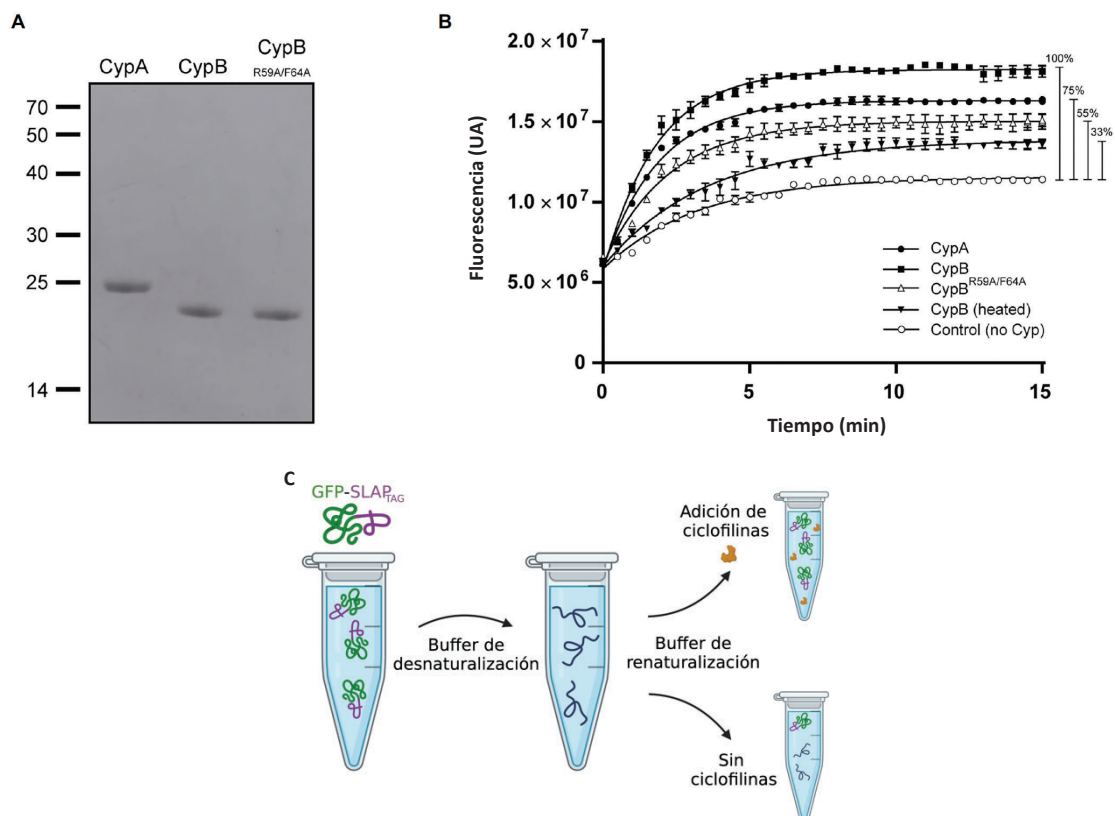


Fig. 44: Determinación de la actividad de la PPIasa de las proteínas recombinantes CypA, CypB y CypBR59A/F64A. (A) SDS-PAGE de ciclofilinas recombinantes purificadas teñidas con azul de Coomassie. (B) Ensayo de actividad PPIasa con 2 μ M de CypA, CypB, y con la mutante puntual en el sitio activo CypBR59A/F64A. La figura muestra la media y la desviación estándar del experimento por triplicado y es representativa de tres experimentos independientes. (C) Esquema del experimento para la determinación de la actividad PPIasa. GFP-SLAP_{TAG} se desnaturaliza en medio ácido y se renaturaliza en buffer a pH neutro en presencia o ausencia de ciclofilinas. Se utilizó ANOVA bidireccional y la prueba de comparación múltiple de Tukey (dentro de cada fila, comparar columnas) para analizar la significación estadística de los resultados, **** $p < 0.0001$. [128]

Se observó que la proteína GFP se encuentra correctamente plegada y presenta fluorescencia cuando está fusionada a SLAP_{TAG}, y que su fluorescencia disminuye significativamente al ser desnaturalizada en medio ácido (Fig. 44). Asimismo, se observó que la fluorescencia era recuperada al ser diluida en buffer de plegamiento a pH 7,5. Incluso, la velocidad de plegamiento y recuperación de la fluorescencia fue mayor en presencia de las ciclofilinas de *Brucella*, indicando que estas proteínas presentan actividad PPIasa. Mas aún, CypB presentó mayor actividad PPIasa que CypA. CypB^{R59A/F64A}, como era esperado, presentó una disminución significativa en la actividad PPIasa, aunque dicha actividad no fue nula ya que la mutación permite una actividad enzimática residual.

Los resultados de las mediciones de actividad de las ciclofilinas de *Brucella* fueron publicados recientemente [128].

1. *Escisión de la etiqueta molecular*

Como se comentó en la Introducción, las etiquetas de afinidad han simplificado enormemente el proceso de purificación de proteínas recombinantes, pero muchas aplicaciones requieren proteínas nativas libres de aminoácidos extraños [56]. Además, mientras que muchas proteínas etiquetadas conservan su integridad estructural y actividad biológica, otras claramente no lo hacen. Por lo tanto, siempre que sea posible, es recomendable eliminar las etiquetas de las proteínas recombinantes [53].

Aunque se han utilizado métodos químicos y enzimáticos para escindir proteínas de fusión en sitios diseñados, solo las enzimas proteolíticas naturales tienen la especificidad requerida para ser reactivos ampliamente útiles para este propósito [56].

La proteasa 3C de Rhinovirus 14 humano (HRV-3c) está disponible comercialmente en forma de una proteína de fusión a glutatión S-transferasa (GST) llamada proteasa PreScission™. La proteasa 3C de Rhinovirus también se ha fusionado con las etiquetas His₆ y MBP en *E. coli*, con DsbA y con el péptido aceptor de biotina (BAP) [68].

Se ha estudiado la secuencia peptídica de corte para la proteasa, estableciéndose que el octapéptido LEVLFQGP, llamado “sitio de la proteasa PreScission”, se aproxima al sitio óptimo de reconocimiento [65].

Como se mostró en la Fig. 35-37, se realizó la construcción de la proteasa HRV-3C fusionada al SLAP_{TAG}, construcción llamada SLAP_{ASE}. La proteasa se expresó y purificó para evaluar su actividad.

Asimismo, se generó un vector bacteriano para la fusión de proteínas a la secuencia de reconocimiento de SLAP_{ASE} y al SLAP_{TAG}. Además, se generó una proteína reportera para la actividad de la SLAP_{ASE} (GFP-LEVLFQGP-SLAP_{TAG}), la cual porta el sitio de reconocimiento para la proteasa (Fig. 35, tercera construcción). Se evaluó el clivaje con SLAP_{ASE} y la purificación de GFP consecuentemente sin etiqueta molecular, para lo cual

se estableció un protocolo que se representa en la figura 45, protocolo que modifica los pasos finales del protocolo original (Fig. 29). Luego de cargar la Bio-Matrix con GFP-LEVLFGQP-SLAP_{TAG} por incubación con un lisado total de *E. coli* (Fig. 45, pasos 1-3), se procedió a agregar SLAP_{ASE} e incubar durante una hora a 4°C para liberar la proteína GFP sin etiqueta. Como puede verse por SDS PAGE y confirmarse por Western Blot en las figuras 46 y 47, la GFP se liberó en la fracción del percolado (FT) sin SLAP_{TAG}, disminuyendo consecuentemente su tamaño molecular. Como control, se eluyó la fracción de proteínas remanentes unidas a la Bio-Matrix con buffer de elución, observándose la liberación de la proteasa SLAP_{ASE} y del SLAP_{TAG} proveniente del clivaje de GFP-LEVLFGQP-SLAP_{TAG}.

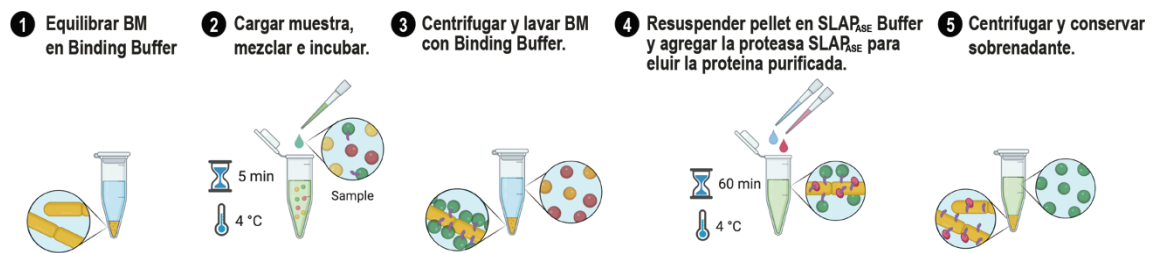


Fig. 45: Protocolo optimizado para la purificación de GFP-LEVLFGQP-SLAP_{TAG} sin etiqueta molecular utilizando SLAP_{ASE}. Descripción gráfica del protocolo de cromatografía de afinidad para la purificación de proteínas recombinantes eliminando el SLAP_{TAG}. Creado con BioRender.com.

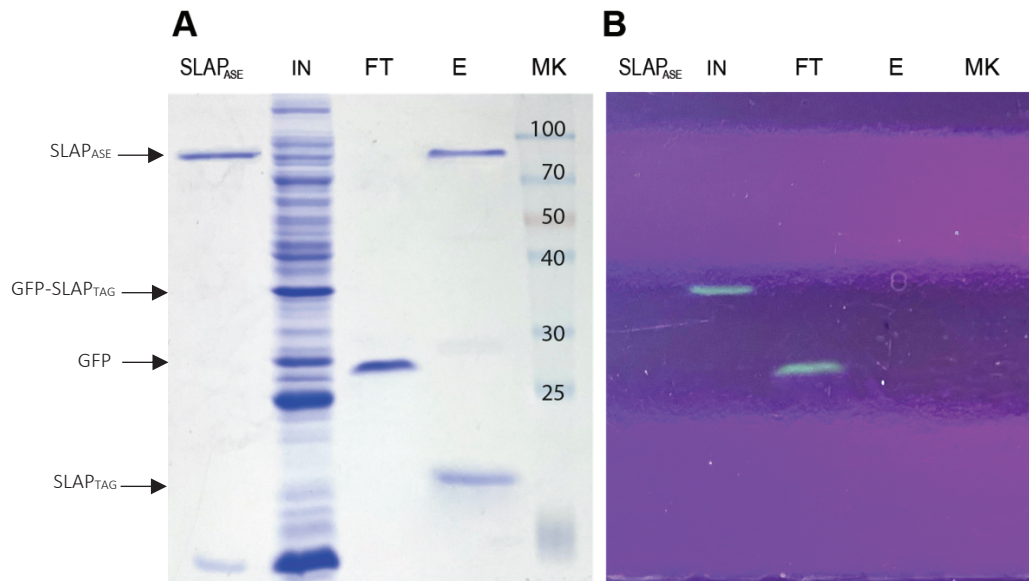


Fig. 46: Análisis por SDS-PAGE de purificación de GFP utilizando SLAP_{ASE}. Fracciones de purificación de GFP por proteólisis utilizando SLAP_{ASE} con tinción de Coomassie Blue (A) o bajo luz UV (B). SLAP_{ASE} = proteína SLAP_{ASE} purificada; IN = Input, sobrenadante de cultivo; FT = percolado; W = lavado; E = elución; MK = marcador proteico (kDa).

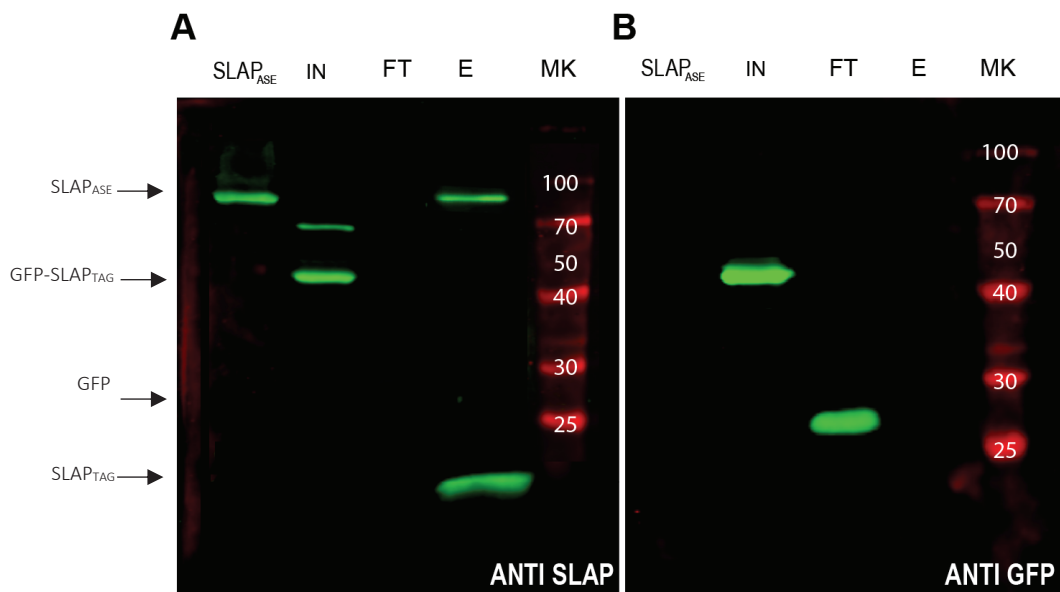


Fig. 47: Análisis por Western blot de purificación de proteínas utilizando SLAP_{ASE}. Fracciones de purificación de GFP por proteólisis utilizando SLAP_{ASE} revelado con anticuerpos policlonales anti-SLAP_{TAG} (A) y anti-GFP (B). SLAP_{ASE} = proteína SLAP_{ASE} purificada; IN = Input, sobrenadante de cultivo; FT = percolado; W = lavado; E = elución; MK = marcador proteico (kDa).

2. Purificación de anticuerpos

La purificación de anticuerpos involucra el aislamiento de las inmunoglobulinas desde el suero (anticuerpo policlonal) o del sobrenadante de cultivo celular de una línea celular de hibridoma (anticuerpo monoclonal) [134].

La proteína A es un componente de la pared celular que es producido por diferentes cepas de especies bacterianas *Staphylococcus aureus*. Esta proteína tiene la capacidad de unirse a la región Fc de la inmunoglobulina IgG, teniendo cuatro sitios de unión a FC de alta afinidad a IgG [135], [136].

La proteína G es un componente de la pared celular que se ha aislado de los *Streptococci* del grupo G. La proteína G también se une a la inmunoglobulina a través de la región Fc, y sólo se une débilmente al fragmento Fab de un anticuerpo [137]. Esta proteína se utiliza para purificar las proteínas que no se unen o se unen con poca afinidad a la proteína A, como es el caso de algunas inmunoglobulinas de mamíferos [135], [136].

La proteína A/G representa una proteína genéticamente modificada para combinar las propiedades de la proteína A y la proteína G. La proteína A/G es una proteína recombinante que posee 6 sitios de unión a IgG y es utilizada para purificar IgG policlonal de muchas especies [134].

Con el fin de evaluar la posibilidad del uso del SLAP_{TAG} para la purificación de anticuerpos policlonales y monoclonales, se fusionó la proteína A/G al dominio SLAP_{TAG}. La proteína se expresó en *E. coli* y se realizó una ruptura celular por sonicación como se describe en Métodos. Las distintas fracciones del experimento de expresión se muestran en la Fig. 48. Como puede observarse, la proteína A/G-SLAP_{TAG} forma cuerpos de inclusión (Fig. 48, fracción insoluble) que se detectan en la fracción insoluble y no se detectan en la fracción soluble que corresponde al sobrenadante (Fig. 48, fracción soluble). Los resultados indican que la construcción evaluada en las condiciones de expresión ensayadas no puede ser utilizada para la purificación de anticuerpos puesto que no logra un correcto plegamiento, el cual es necesario para su función.

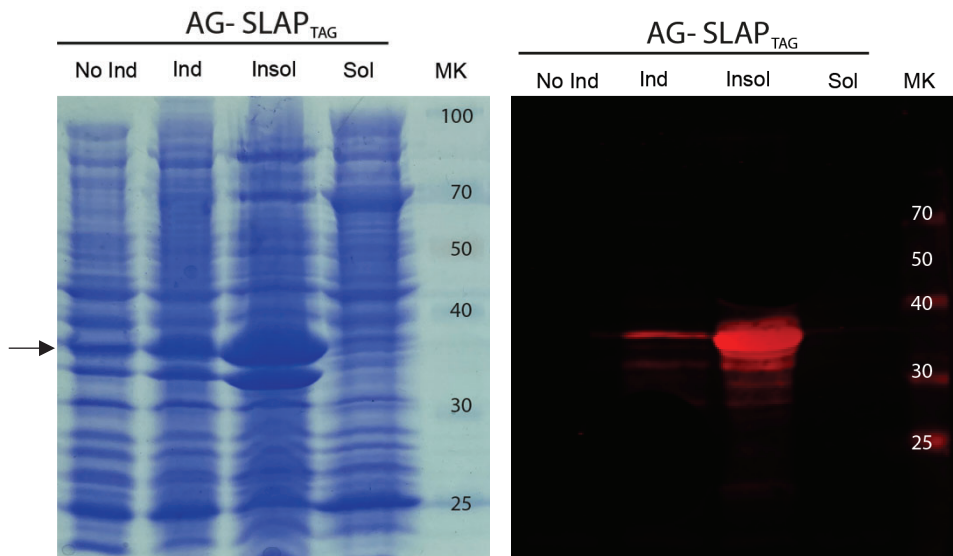


Fig. 48: Análisis de la solubilidad de AG-SLAP_{TAG}. Fracciones de expresión de la proteína AG-SLAP_{TAG} analizadas por SDS-PAGE seguido de tinción con Coomassie Blue (izquierda) y por Western Blot (derecha). La proteína tiene un tamaño esperado de 38,1 KDa. La flecha indica el tamaño de banda correspondiente. No Ind = no inducido; Ind = Inducido; Insol = fracción insoluble; Sol = fracción soluble; MK = marcador proteico (KDa).

CAPÍTULO II: OTRAS MATRICES

Con el objetivo de potenciar los usos del sistema purificación de proteínas basado en SLAP_{TAG}, se exploraron distintos soportes para la Bio-Matrix y diferentes matrices.

BOLITAS DE POLIPROPILENO

Un gran número de bioprocesos se basan en la unión efectiva de microorganismos sobre superficies y el establecimiento de una biopelícula en algún tipo de soporte, membrana o material de embalaje. El polipropileno es un material sobre el cual pueden establecerse biopelículas de microorganismos como *Bacillus subtilis* [138].

El polipropileno (PP) es termoplástico perteneciente al grupo de las poliolefinas . Se obtiene en el proceso de polimerización del propileno. El polipropileno se encuentra en muchas películas y estructuras de películas multicapa debido a su resistencia, tenacidad y alto punto de fusión. Cuando se formulan con los aditivos adecuados, las resinas de polipropileno pueden exhibir una excelente procesabilidad [139]. La estructura química del homopolímero es bastante simple, un grupo metilo ubicado en cada unidad de carbono troncal como se muestra en la Fig. 49 [140]. Sin embargo, hoy en día polipropileno significa todo un mundo de polímeros innovadores con microestructuras novedosas y bien controladas, con múltiples propiedades y aplicaciones adaptadas [141].

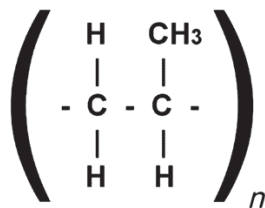


Fig. 49: Estructura química de la unidad polimérica del polipropileno. [139]

A fin de utilizar el polipropileno como soporte cromatográfico se evaluó la generación de biopelículas de *B. subtilis* sobre bolitas de polipropileno. Para ello se cultivaron bacterias en presencia del material de soporte a distintos tiempos y temperaturas y se evaluó la

presencia bacteriana mediante tinción con cristal violeta (Fig. 50). Los resultados se cuantificaron mediante medición de absorbancia a 590 nm (Fig. 51).

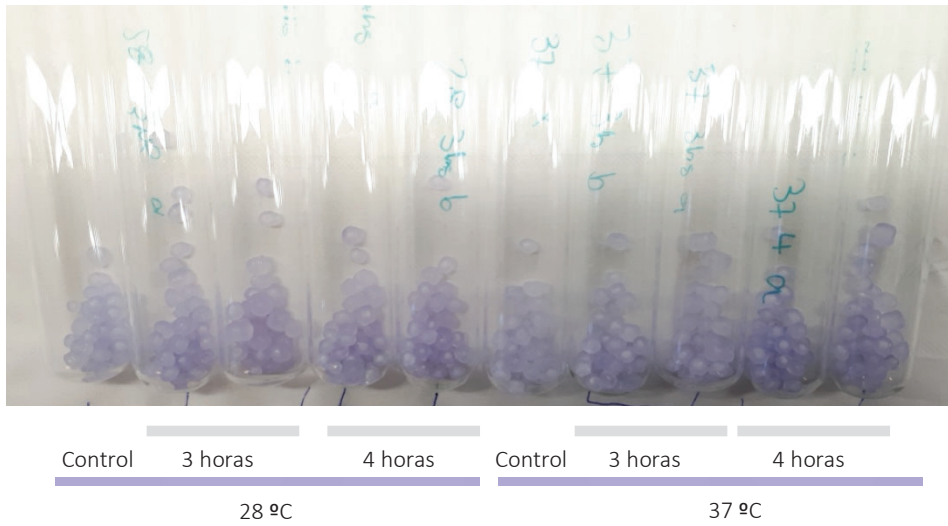


Fig. 50: Foto de tubos de vidrio con bolitas de polipropileno incubadas a diferentes temperaturas y tiempos con cultivos de *B. subtilis* y teñidos con cristal violeta.

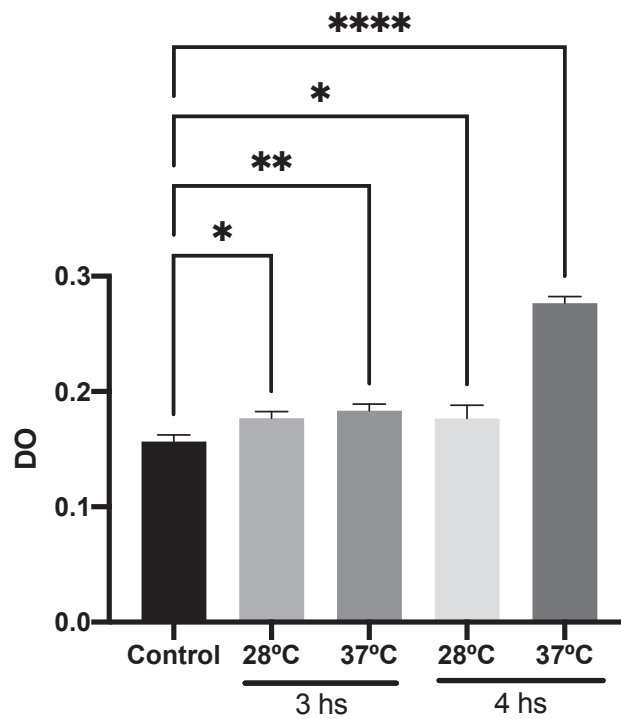


Fig. 51: Cuantificación de la presencia bacteriana en las bolitas de polipropileno por medición de la absorbancia a 590 nm.

Debido a que obtuvieron la mayor absorbancia, se eligieron las bolitas de polipropileno incubadas por 4hs a 37°C. Con ellas se intentó purificar (H₆)-GFP-SLAP_{TAG}. Las fracciones de purificación se muestran en la Fig. 52. Como puede observarse, no se visualizan bandas proteicas en la calle correspondiente a la elución, sino que la banda correspondiente a (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} pareciera percolar. Por tanto, no se logró optimizar el método para purificar la proteína recombinante.

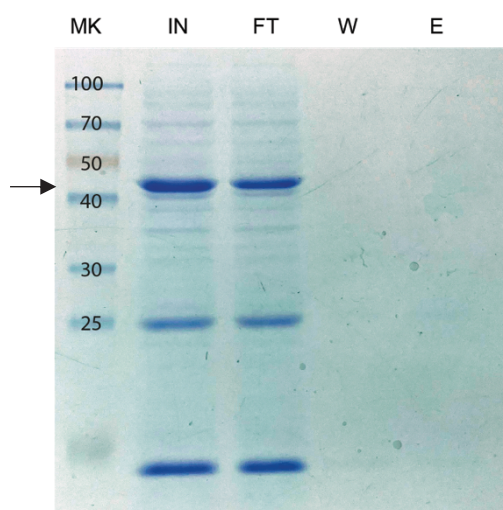


Fig. 52: Análisis de la purificación de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} utilizando *B. subtilis* adherida a bolitas de polipropileno. SDS-PAGE con tinción de Coomassie Blue de la purificación de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG}. La flecha indica el tamaño de banda correspondiente a (H₆)-GFP-SLAP_{TAG}. MK = marcador proteico (kDa); IN = Input; FT = percolado; W = lavado; E = elución.

ESPONJAS DE POLIURETANO

La espuma o esponja de poliuretano (PUF) ha adquirido recientemente una gran relevancia como carrier en la inmovilización de células, sea por adhesión o por atrapamiento, un hecho ejemplificado por el creciente número de aplicaciones reportadas en la literatura [142]–[144].

Estas aplicaciones incluyen la eliminación de compuestos orgánicos, el control de residuos de olores, la fermentación con ácido acético, la eliminación de hidrocarburos y

la oxidación de sulfato ferroso. En tales estudios, varios microorganismos fueron inmovilizados (o coinmovilizados) en este soporte utilizando diferentes tipos de reactores como tanques agitados, columnas empaquetadas o biofiltros [144], [145].

El PUF es un material inerte con buenas propiedades mecánicas (alta resistencia y elasticidad) y muy bajo costo comercial. Este material también tiene una alta porosidad (cerca del 97%) y, por lo tanto, tiene una gran superficie de adsorción. Además de esto, la PUF no sufre los inconvenientes de escalado experimentados con otras matrices de encapsulación porque se pueden preparar fácilmente grandes volúmenes de este soporte [145].

A fin de utilizar el PUF como soporte cromatográfico se generaron esponjas de PUF con cultivos de *B. subtilis* inmovilizado durante el proceso de polimerización (Fig. 53), tal como se describe en materiales y métodos.



Fig. 53: Matrices de poliuretano. Foto de esponjas de poliuretano con *B. subtilis* inmovilizado durante la polimerización.

Se evaluó la capacidad de estas esponjas de purificar proteínas etiquetadas con SLAP_{TAG}. Para ello se incubaron sobrenadantes de cultivo de sobreexpresión de OMP-SLAP_{TAG} con las esponjas y se realizó un SDS-PAGE con las distintas fracciones de purificación. Como se observa en la figura 54, la calle correspondiente a la elución no presenta bandas

proteicas. Se concluye que no se logró optimizar el proceso para purificar proteínas etiquetadas con SLAP_{TAG} mediante esta técnica.

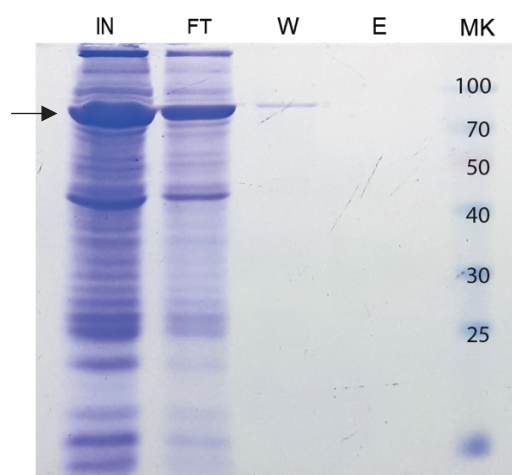


Fig. 54: Análisis de la purificación de OMP-SLAP_{TAG} utilizando *B. subtilis* inmovilizada en esponjas de poliuretano. SDS-PAGE con tinción de Coomassie Blue de la purificación de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG}. La flecha indica el tamaño de banda correspondiente a OMP-SLAP_{TAG}. IN = Input; FT = percolado; W = lavado; E = elución; MK = marcador proteico (kDa).

IMPRESOS 3D DE POLIHIDROXIBUTIRATO-CO-VALERATO (PHBV)

El poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato), también conocido como poli(ácido 3-hidroxi-butírico-co-3-ácido hidroxi-valérico) o simplemente poli(hidroxi-butirato-co-hidroxi-valerato), abreviado generalmente como PHBV o PHBHV, se origina a partir de la inserción de unidades de 3-hidroxi-valerato (HV) al biopolímero PHB [146].

El PHBV es un poliéster alifático con la estructura química que se muestra en la Figura 55. Además, no es tóxico, es 100% biodegradable, biocompatible con muchos tipos de células, se caracteriza por su alto grado de cristalinidad, y es resistente a la radiación ultravioleta y a cantidades aceptables de alcoholes, grasas y aceites. Es un polímero rígido y bastante frágil, y puede disolverse en disolventes clorados [147].

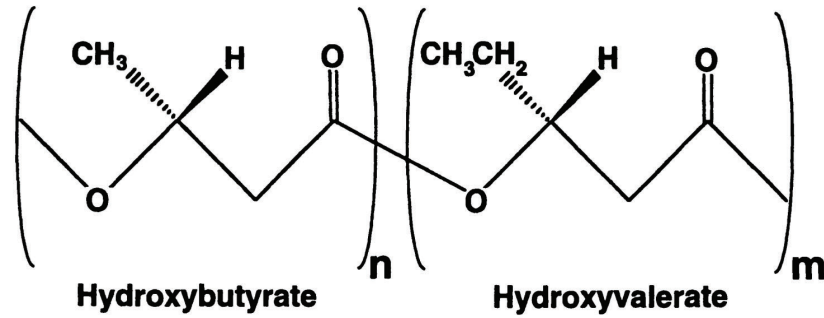


Fig. 55: Estructura química del PHBV. [146]

Las características de biocompatibilidad y biodegradabilidad del PHBV lo convierten en un material excepcional con amplias aplicaciones en una gran variedad de sectores. Las excelentes propiedades del PHBV, como su capacidad de absorción, origen biológico, baja citotoxicidad, piezoelectricidad y termoplaticidad, lo hacen muy prometedor para aplicaciones de biomateriales, como la fabricación de stents cardiovasculares, sistemas de liberación y transporte de fármacos, suturas quirúrgicas absorbibles y envases médicos [147]. En el campo de la ingeniería de tejidos, las aplicaciones incluyen la elaboración de parches de tejido, implantes biodegradables, biosensores y la fabricación de andamios porosos que permiten el tratamiento de defectos óseos causados por enfermedades o lesiones donde los tratamientos convencionales son ineficaces [148].

En otros sectores industriales fuera del campo biomédico, existe una amplia gama de aplicaciones que van desde bolsas, contenedores, envases, cosméticos, productos de higiene (toallas, pañales y pañuelos) hasta productos que requieren una alta resistencia mecánica, como cascos para ciclistas y tableros de cableado impresos (para electrónica) y varios paneles de automóviles [148].

A fin de utilizar el PHBV como soporte cromatográfico, se evaluó la generación de biopelículas de *B. subtilis* sobre impresiones 3D de PHBV. Para ello se cultivaron bacterias en presencia del material de soporte y se evaluó la presencia bacteriana mediante tinción con cristal violeta (Fig. 56) comprobándose dicha presencia.

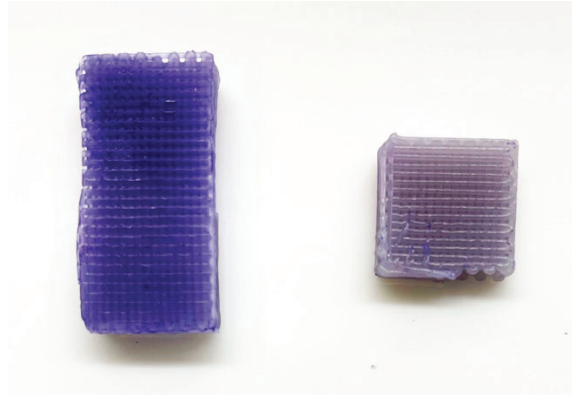


Fig. 56: Foto de impresos 3D de polihidroxibutirato-co-valerato tenidos con cristal violeta. En la izquierda puede observarse un ejemplo de impreso 3D sobre el que se adhirieron *B. subtilis*. En la derecha se observa un ejemplo control de impreso 3D sin bacterias adheridas.

Luego, se intentó purificar (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} con los impresos recubiertos de *B. subtilis*. Para ello se incubaron dichos impresos 3D por una hora a 4°C con lisados bacterianos que sobre-expresaban (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} y se prosiguió con el protocolo establecido para la purificación con la Bio-Matrix. Las fracciones de purificación se muestran en la Fig. 57. Como puede observarse no se visualiza la banda proteica esperada en la calle correspondiente a la elución, sino que (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} presente en el input pareciera percolar completamente. Se concluye que no se logró optimizar este método para purificar (H₆)-GFP-SLAP_{TAG}.

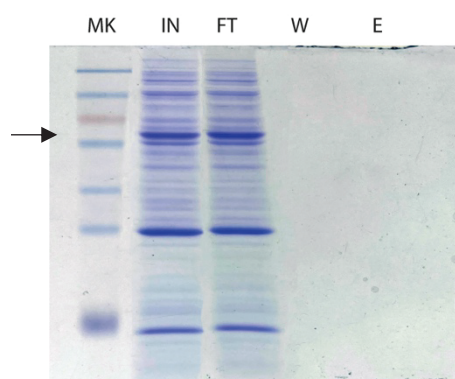


Fig. 57: Análisis de la purificación de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} utilizando *B. subtilis* adherido a impresos 3D de polihidroxibutirato-co-valerato. SDS-PAGE con tinción de Coomassie Blue de la purificación de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG}. La flecha indica el tamaño de banda correspondiente a (H₆)-GFP-SLAP_{TAG}. MK = marcador proteico (KDa); IN = Input; FT = percolado; W = lavado; E = elución.

MINIESFERAS DE QUITINA Y QUITOSANO

La quitina (poli-(1→4)-2-acetoamido-2-desoxi-D-glucosa), un polímero lineal de alto peso molecular de N-acetilglucosamina (GlcNAc), es el segundo polímero más abundante en la naturaleza que se encuentra principalmente en el exoesqueleto de artrópodos [149]. A pesar de ser un polímero similar a la celulosa, tiene un grupo acetamida en la posición C-2 en lugar de un grupo hidroxilo, lo que le confiere propiedades únicas. La quitina es biodegradable, biocompatible, tiene alta resistencia química, baja inmunogenicidad y bajo costo [150]. Estos atributos lo convierten en un material muy interesante para procesos cromatográficos [82], [83], [150].

El quitosano es un polímero biodegradable, no tóxico, biocompatible, derivado desacetilado de la quitina. Se presenta como un copolímero lineal de residuos de 2-acetamida-2-dioxi-β-d-glucosa y 2-amino-2-dioxi-β-d-glucosa distribuidos aleatoriamente [149]. En la figura 58 se muestra la estructura química de estos biopolímeros.

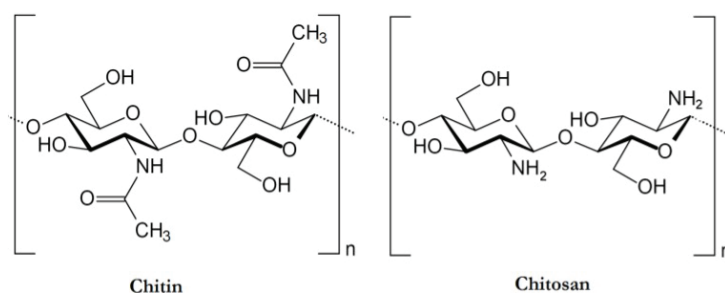


Fig. 58: Estructura química de la quitina y el quitosano. [149]

Tanto la quitina como el quitosano presentan la ventaja de ser biopolímeros naturales, biodegradables y ambientalmente seguros. Ambos polímeros tienen muchos usos y aplicaciones potenciales en diferentes campos que están ganando interés. Tales aplicaciones incluyen áreas tan diferentes como sistemas de administración de fármacos y nuevos biomateriales para el modelado 3D. El quitosano también se puede aplicar en el procesamiento posterior de proteínas, donde las matrices cromatográficas hechas con este material de soporte son productos valiosos [82], [83].

El quitosano tiene muchas propiedades fisicoquímicas que lo vuelven interesante, como la sensibilidad al pH, ya que es soluble en medios ácidos diluidos e insoluble en medios neutros o básicos. Por el contrario, la quitina es insoluble en solventes comunes a cualquier valor de pH. Esta característica hace que el quitosano sea fácil de manejar para preparar fibras, hidrogeles, micro/nanopartículas o membranas. Además, presenta grupos amino e hidroxilo libres, que facilitan la inmovilización de varios ligandos, por lo que a menudo se selecciona como material de soporte con fines cromatográficos [83]. Con respecto a este propósito cromatográfico, es bien sabido que las perlas de quitosano o miniesferas formadas por la separación de fase ácido/base poseen una estructura interna de poro abierto, que consiste en macro y meso poros que facilitan la unión a proteínas [151]. Por sus aspectos difusivos, en cuanto a la dinámica de unión a proteínas, este tipo de soporte cromatográfico tiene interesantes aplicaciones en procesos de operación por lotes, especialmente para el procesamiento de materias primas [152]

Como se mencionó en la Introducción, trabajos anteriores[111] estudiaron targets de interacción de la proteína de SlpA de *Lactobacillus* midiendo la capacidad de unión de la proteína completa o proteínas quiméricas que portaban diferentes regiones proteicas de SlpA al peptidoglicano (PG), ácido lipoteicoico (LTA), polisacáridos de la pared celular (CWPS), lipopolisacárido (LPD), quitina, quitosano, mucina, fibrinógeno, colágeno y ácido hialurónico, y reportaron la afinidad del dominio carboxilo terminal por la quitina y el quitosano (Fig. 59) .

SlpA sequence position		Nº amino acids		PG	LTA	CWPS	LPS	Chitin	Chitosan	Mucin	Fibronectin	Collagen	Hyaluronic Acid	BSA
31-444	Mature SlpA	413		++	++	++	ND	++	++	++	++	++	++	-
31-285	NT-GFP	254		-	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-
285-444	GFP-CT1	159		++	++	++	++	++	++	++	-	-	+	-
321-444	GFP-CT2	123		+	+	+	ND	+	+	+	-	-	ND	-
321-378	GFP-CT3	57		-	-	-	ND	-	-	-	-	-	ND	-
239-444	GFP-CT4	205		++	++	++	ND	++	++	++	-	-	ND	-
239-378	GFP-CT5	139		-	-	-	ND	-	-	-	-	-	ND	-

Fig. 59: Interacción de SlpA y proteínas de fusión quiméricas con diferentes componentes. Los componentes de la pared celular procariota (PG, LTA, CWPS), macromoléculas eucariotas (mucina,

fibronectina, ácido hialurónico de colágeno) y polímeros (quitina y quitosano) se inmovilizaron en una membrana de PVDF y se probaron con SlpA maduro o proteínas de fusión fluorescentes quiméricas. Los dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRD) se representan en cajas negras. Los símbolos más y menos indican el nivel de interacción. ND no determinado. [111]

Por todo lo mencionado , y para sortear las dificultades regulatorias que la Bio-Matrix pudiera presentar en alguna de las aplicaciones, se procedió a utilizar miniesferas de quitosano y resinas de quitina y quitina magnética analizando su capacidad de purificar proteínas fusionadas a SLAP_{TAG}.

Para ello se incubaron por una hora a 4°C los diferentes soportes con lisados bacterianos que sobre-expresaban (H₆)-GFP-SLAP_{TAG}. Luego de ser lavados con PBS, se los eluyó con una solución de 0.1 M ácido acético, como está descrito para eluciones con dichas matrices. Como se muestra en la figura 60 las resinas de quitina no permitieron purificar (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} en cantidades detectables mediante SDS-PAGE, mientras que las miniesferas de quitosano eluyeron la proteína fusionada a SLAP_{TAG} junto con impurezas.

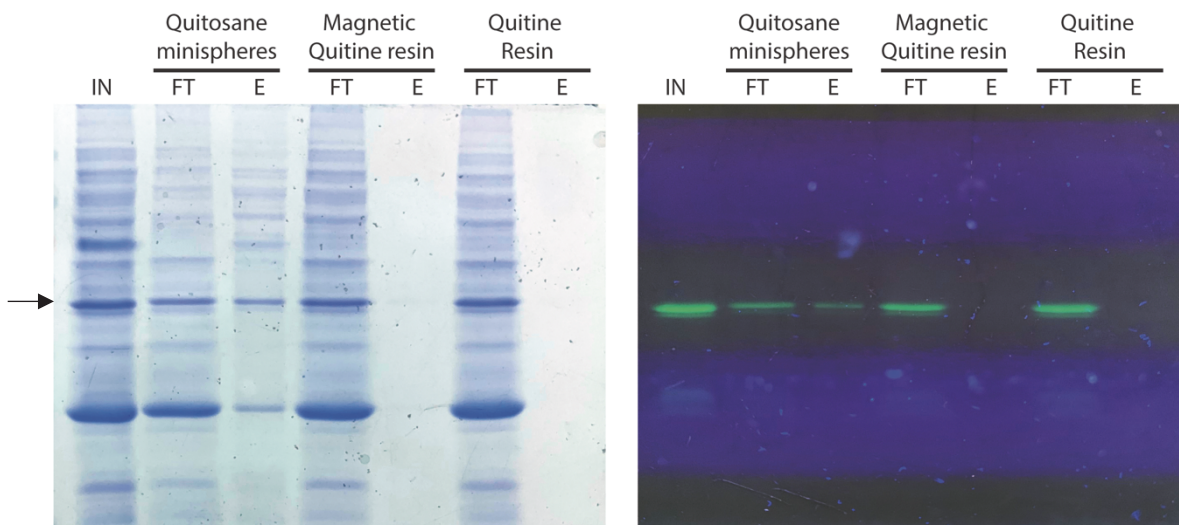


Fig. 60: Análisis de diferentes matrices para la purificación de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG}. SDS-PAGE con tinción de Coomassie Blue (izquierda) o bajo luz UV (derecha) de fracciones de purificación de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} con miniesferas de quitosano, resina de quitina y resina de quitina magnética. IN = Input; FT = percolado; E = elución. La flecha indica el tamaño correspondiente a (H₆)-GFP-SLAP_{TAG}.

Debido a nuestros conocimientos sobre el SLAP_{TAG} nos preguntamos si el protocolo puesto a punto para la Bio-Matrix sería útil para mejorar la purificación de proteínas fusionada a SLAP_{TAG} mediante miniesferas de quitosano. Por tanto, repetimos la purificación de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} eluyendo con buffer carbonato (pH 10, 200 mM NaCl). Como se muestra en la figura 61, se logró exitosamente la purificación de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG}, disminuyendo considerablemente las impurezas que copurificaban al eluir con ácido acético.

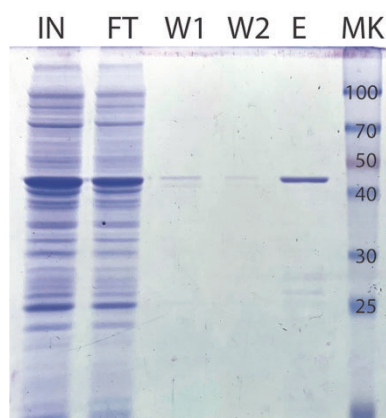


Fig. 61: Análisis de la purificación de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} utilizando miniesferas de quitosano. SDS-PAGE con tinción de Coomassie Blue de la purificación de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG}. IN = Input; FT = percolado; W1 = lavado1; W2 = lavado2; E = elución; MK = marcador proteico (KDa).

BIO-MATRIX MAGNÉTICA

Hemos mencionado anteriormente que la inmovilización de células, proteínas, enzimas, anticuerpos y otros compuestos biológicamente activos sobre un soporte sólido inerte ha encontrado varias aplicaciones en el campo de la biotecnología y la biomedicina. Convencionalmente, las enzimas y las células se inmovilizan sobre un soporte sólido, como matrices poliméricas sintéticas, o atrapadas dentro de la matriz de gel formada por diferentes polisacáridos como alginato, celulosa o agarosa [144]. A propósito de ello, en las secciones anteriores evaluamos diferentes polímeros como soportes para la cromatografía de afinidad basada en SLAP_{TAG}.

Los enfoques convencionales de separación y purificación de biomoléculas a partir de fuentes biotecnológicas, como la producción de anticuerpos en la industria farmacéutica,

requieren numerosos pasos: filtración, centrifugación, floculación, sedimentación o cristalización y técnicas de cromatografía [153]. El desarrollo de enfoques de alta tecnología o innovadores sigue siendo el principal desafío para promover el procesamiento posterior en un campo tecnológico líder y mejorar la productividad. En este sentido, la separación magnética es un candidato interesante debido a algunas características ventajosas importantes [154]:

- Captura y purificación integrada en un solo paso de la proteína blanco (alta afinidad y selectividad)
- Alto rendimiento
- Procesamiento semicontinuo con bajo consumo energético.

Es por ello que la separación magnética puede ayudar a reducir los costos y aumentar los rendimientos y la productividad en comparación con los procesos tradicionales [154]. El procesamiento continuo o semicontinuo a presión relativamente baja conduce a bajos costos de energía de procesamiento. El proceso permite la adaptación a las necesidades de cada sistema y podría conducir a un mayor número de bioproductos factibles para la explotación industrial [155].

Durante las últimas décadas, los sistemas basados en partículas magnéticas han permitido el desarrollo de matrices de afinidad para la separación de enzimas. Por ejemplo, la purificación en un solo paso de la alcohol-deshidrogenasa hepática de caballo mediante perlas magnéticas de Sepharose® junto con 5'-AMP se ha logrado con éxito [156]. Asimismo, las microesferas de alginato magnético se han utilizado para la purificación por afinidad de la α -amilasa [157]

Del mismo modo, Qiagen Inc., Alemania, ha desarrollado protocolos para la purificación y para ensayos de proteínas basados en perlas de agarosa magnética Ni-NTA para adaptarse a diferentes aplicaciones. Las perlas de agarosa magnética marcadas con Ni-NTA (ácido nitriloacético) se han utilizado para ensayos versátiles de magnetocaptura utilizando proteínas etiquetadas con His_{TAG} [155].

Entre las partículas magnéticas disponibles, las nanopartículas de hierro han cobrado interés en la industria. Las nanopartículas de óxido de hierro con un fuerte momento

magnético tienen un potencial atractivo y novedoso debido a que son detectables, manipuladas remotamente y responden por un campo magnético [158]. Además, las nanopartículas de óxido de hierro exhiben inercia química y resistencia a la oxidación, lo que explica su no toxicidad con respecto a las bacterias [159]. Además de esto, las nanopartículas poseen funciones hidroxilo en su superficie, lo que permite su adsorción en la superficie de las bacterias [158], [160]. Trabajos anteriores reportan la utilización de nanopartículas de hierro adsorbidas sobre la superficie de *Bacillus subtilis* con fines cromatográficos [159], [161], [162].

Dado que confirmamos la eficiencia y universalidad de SAC para la purificación de proteínas recombinantes, exploramos una cromatografía de afinidad magnética, alternativa de la SAC (Fig. 62). Para ello se generó una BM con propiedades magnéticas por acoplamiento de nanopartículas de hierro, según lo descrito en materiales y métodos. Como se muestra en la Fig. 62-64 ([Video disponible⁵](#)), (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} se purificó en unos pocos y sencillos pasos. Como se muestra en la SDS-PAGE (Fig. 63), el protocolo SAC adaptado para cromatografía magnética (BM_{mag}) fue capaz de purificar la proteína reportera (H₆)-GFP-SLAP_{TAG} de manera muy eficiente (Fig. 63, calle E). Curiosamente, este protocolo se puede adaptar a dispositivos comerciales que utilizan fuerza magnética para la purificación de proteínas o ADN (como King Fisher Flex de ThermoFisher). En la Fig. 64, todo el proceso de purificación fue monitoreado por observación directa bajo luz UV ([Video disponible⁵](#)). Cabe destacar que la unión del BM_{mag} a GFP apagó la fluorescencia de esta proteína, un efecto ya descrito para la unión de metales de transición a GFP o la unión de cationes de hierro a proteínas fluorescentes (Fig. 64, tubo IN + BM_{mag})

⁵ <https://www.youtube.com/watch?v=Ry9LM9QheW4>



Fig. 62: Purificación GFP-SLAP_{TAG} mediante Bio-Matrix Magnética. Descripción gráfica del protocolo de purificación para Bio-Matrix magnética. Creado con BioRender.com.

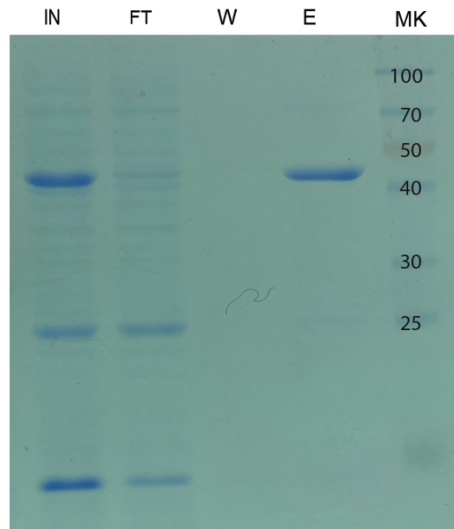


Fig. 63: Análisis de la purificación magnética de (H_6) -GFP-SLAP_{TAG}. SDS-PAGE con tinción de Coomassie Blue de la purificación de (H_6) -GFP-SLAP_{TAG}. IN = Input; FT = percolado; W = lavado; E = elución; MK = marcador proteico (KDa).

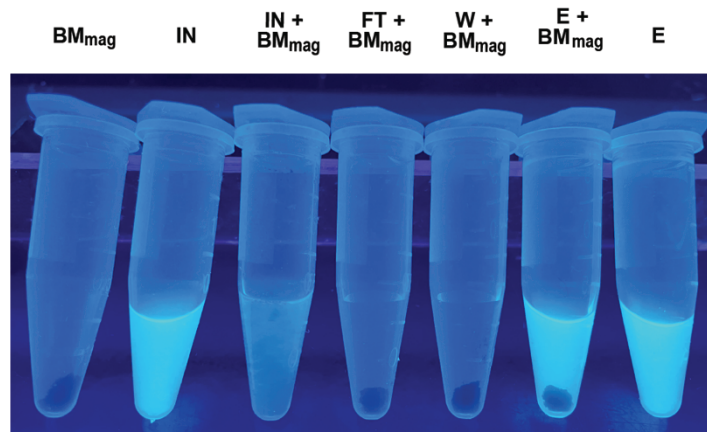


Fig. 64: Foto de tubos de 1,5 ml que contienen fracciones de purificación magnética de GFP-SLAP_{TAG} bajo luz UV. (BM_{mag} = Bio-Matrix magnética; IN = Input; FT = percolado; W = lavado; E = elución). Se observa cómo la fluorescencia de GFP presente en el input se recupera en el eluido.

CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados expuestos en las secciones anteriores de este trabajo, y en función de los objetivos propuestos, se concluye que:

1. Se logró desarrollar un sistema cromatográfico de bajo costo basado en SLAP_{TAG}, con una Bio-Matrix reutilizable y estable a lo largo del tiempo, y se estableció un protocolo para su uso con las condiciones óptimas de pegado y elución.
2. Se logró caracterizar la unión del SLAP_{TAG} a la Bio-Matrix calculando la constante de afinidad y capacidad máxima de unión.
3. Se pudieron calcular rendimientos de purificación, mostrando que los mismos son comparables a sistemas comerciales tal como la cromatografía de afinidad a iones metálicos.
4. Se verificó la universalidad de la SAC, sistema que permite purificar proteínas de diverso tamaño y origen biológico, producidas en diferentes sistemas de expresión (bacteria, células de mamífero y levaduras).
5. Se generaron anticuerpos policlonales que resultaron buenas herramientas para la detección de proteínas fusionadas a SLAP_{TAG}.
6. No se logró expresar proteína A/G fusionada a SLAP_{TAG} soluble, la cual era requerida para la purificación de anticuerpos.
7. Se obtuvieron resultados que sugieren que SLAP_{TAG} no mejora la solubilidad de la proteína a la que se lo fusiona.
8. Se verificó que GFP fusionada a SLAP_{TAG} conserva su estructura proteica.
9. Se adaptó exitosamente la SAC para generar una cromatografía magnética mediante la incorporación de nanopartículas de hierro.

10. Se perfeccionó el sistema cromatográfico para la remoción de la etiqueta molecular, permitiendo la purificación de proteínas sin SLAP_{TAG} mediante proteólisis con SLAP_{ASE}.
11. No se logró purificar proteínas fusionadas a SLAP_{TAG} con las variantes de soporte para la BM. Se probaron soportes que permitieran nuevos formatos cromatográficos como bolitas de polipropileno, espuma de poliuretano e impresos 3D de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato), no logrando optimizar los procesos para que se pudiera purificar proteínas fusionadas a SLAP_{TAG}.
12. Se logró reemplazar la BM por miniesferas de quitosano, las cuales resultaron ser prometedoras en la purificación de proteínas fusionadas a SLAP_{TAG} que presenten mayores exigencias regulatorias.

DISCUSIÓN

Las proteínas son macromoléculas formadas por una secuencia particular de aminoácidos que determina una distribución espacial atómica dada, también conocida como conformación proteica. Lejos de ser una estructura rígida, las proteínas se comportan como nanomáquinas que realizan actividades moleculares precisas debido a los movimientos internos de partes de proteínas o dominios de proteínas. Las proteínas pueden interactuar intramolecular o intermolecularmente con diferentes macromoléculas como proteínas, ADN, ARN, polisacáridos o con compuestos pequeños [163]. Las funciones son muy diversas: algunas proteínas degradan los alimentos para producir nutrientes esenciales (como las enzimas digestivas), proteínas que transportan compuestos críticos para mantener la vida (como la hemoglobina que transporta oxígeno a las células), proteínas críticas para la estructura celular (como la actina, la tubulina o la queratina), proteínas que funcionan como hormonas (como la insulina), proteínas que defienden a los organismos contra patógenos (como los anticuerpos) [163].

Además de la multiplicidad de polipéptidos existentes en la naturaleza, la biología molecular y la biotecnología han generado una miríada de proteínas quiméricas mediante la combinación de diferentes dominios proteicos [164]. La biotecnología de proteínas es un área de investigación emocionante y de rápido crecimiento, con numerosas aplicaciones industriales de gran impacto económico.

La creciente demanda de desarrollar métodos de purificación de proteínas eficientes y rápidos está impulsando la investigación y el crecimiento en esta área. Los avances y progresos en las técnicas y métodos de purificación de proteínas han sido tales que se puede esperar razonablemente que cualquier proteína de un orden dado de estabilidad pueda purificarse según los estándares de homogeneidad actualmente aceptables. Sin embargo, el costo de producción de proteínas sigue siendo extremadamente alto, y el procesamiento posterior constituye una proporción sustancial del costo total [16].

Ejemplo de esto es la pandemia de SARS-CoV-2 que ha generado una crisis mundial multidimensional con efectos devastadores en la salud humana, y que también ha tenido un impacto masivo en la economía en todas partes. Como consecuencia directa de este desastre global, los gobiernos nacionales se vieron envueltos en una furiosa competencia mundial para adquirir todos los suministros médicos necesarios. Además de la escasez de

maskarillas o ventiladores, la enorme demanda de reactivos de diagnóstico (como las proteínas recombinantes) ha obstaculizado el desarrollo de nuevos kits de diagnóstico viral basados en ELISA o pruebas PCR en tiempo real.

Entre otras cosas, la crisis pandémica nos ha enseñado que la disponibilidad de cromatografías de afinidad de bajo costo podría ser una herramienta útil para producir proteínas recombinantes puras para desarrollar pruebas de diagnóstico de bajo costo.

En esta tesis nos propusimos la adaptación del dominio de unión de SlpA de *Lactobacillus acidophilus* como una etiqueta molecular. La matriz basada en *B. subtilis*, aquí llamada Bio-Matrix, mostró un alto rendimiento en su capacidad de unión y elución, y buenos parámetros de purificación para purificar (H₆)-GFP-SLAP_{TAG}, la proteína modelo utilizada para optimizar la cromatografía de afinidad basada en SLAP_{TAG}. Como se demostró aquí, SAC es una herramienta útil y conveniente para la purificación de proteínas por una variedad de razones. En primer lugar, con respecto al sistema de cromatografía en general, se demostró su universalidad y el rendimiento competitivo alcanzado, similar a los obtenidos en la cromatografía de afinidad comercial.

En segundo lugar, se sabe que en un esquema convencional de downstream en el procesamiento de proteínas, la cromatografía es el paso más costoso [16]. El protocolo SAC utiliza solo reactivos simples y de bajo costo, lo que permite una ventaja económica en la purificación de proteínas sobre los sistemas comerciales actuales. Además, la Bio-Matrix se "cultiva" en lugar de sintetizarse químicamente, lo que permite una autosuficiencia barata, fácil y continua. La Bio-Matrix está disponible en los términos y cantidades requeridos por el usuario. Además, como los ligandos (LTA y ácido teicoico) se integran naturalmente a la superficie del BM, no hay necesidad de reacciones químicas para entrecruzarlos a la matriz, simplificando la generación de la matriz.

En la última década, la introducción de tecnologías de un solo uso ha iluminado el potencial de reducción de los costos regulatorios y operativos asociados con la cromatografía. Los investigadores señalan su potencial para una operación más simple, tiempos de procesamiento más cortos y un menor consumo de buffers, lo que lleva a una mejor economía [165]. Además, la falta de necesidad de limpieza durante los ciclos de uso

repetidos reduce significativamente los costos [166]. SAC podría ser una cromatografía alternativa de un solo uso para algunas industrias, con el beneficio de ser más ecológica que las disponibles en el mercado, ya que es una matriz de base biológica y biodegradable.

SAC demostró adaptarse con éxito a la eliminación de etiquetas de proteasa. Aunque se están desarrollando nuevas tecnologías para la eliminación de etiquetas (por ejemplo, inteínas), la escisión enzimática de la etiqueta sigue siendo la preferida, ya que es el proceso más controlado, sin escisión prematura y se obtienen los mejores rendimientos [53]. Además, las nuevas tecnologías podrían ser compatibles con la SAC.

En muchos casos, los nanomateriales o las microesferas magnéticas se pueden utilizar en cromatografías de afinidad para procedimientos de purificación de proteínas que consumen menos tiempo [2]. SAC también demostró adaptarse eficazmente a la cromatografía magnética. La adsorción de nanopartículas de hierro en la superficie de BM proporcionó propiedades magnéticas que permitieron una purificación magnética de (H₆)-GFP-SLAP_{TAG}. SAC se puede adaptar a dispositivos que están disponibles comercialmente para otras resinas magnéticas.

En síntesis, la cromatografía de afinidad SLAP_{TAG} es conveniente para la purificación de proteínas en industrias con regulaciones permisivas. SAC se puede adaptar como un sistema interno de purificación de proteínas, disponible para cualquier laboratorio en todo el mundo, para producir proteínas recombinantes puras para investigación, diagnóstico e industria alimentaria. Aunque los resultados hasta ahora obtenidos podrían generar cuestionamientos regulatorios que desaconsejarían el uso de la Bio-Matrix en la purificación de proteínas utilizadas como bioterapéuticas, realizamos esfuerzos para desarrollar una nueva versión de la matriz cromatográfica adecuada para fines industriales o clínicos con regulaciones más estrictas. En este sentido, las matrices de quitosano son prometedoras por su capacidad de purificar proteínas etiquetadas con SLAP_{TAG}. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que optimizando los protocolos de purificación con matrices de este material se podrían alcanzar rendimientos competitivos.

PERSPECTIVAS FUTURAS

1. Con el objetivo de expandir las áreas de aplicación de la SAC en campos donde la Bio-Matrix no pueda utilizarse debido a problemas con la regulación, se buscará profundizar en el estudio del quitosano como matriz de purificación. Para ello se ensayará con distintos tamaños de partícula, más pequeñas que las actuales miniesferas utilizadas. De ese modo se aumentará radicalmente la superficie disponible para la adhesión de proteínas recombinantes fusionadas al SLAP_{TAG}. Asimismo, se evaluará la posibilidad de utilizar soportes monolíticos de quitosano que permitan aumentos en el flujos y presión. Estos soportes tienen las ventajas de incluir tolerancia a mayores presiones, alta permeabilidad, buenas eficiencias de separación y capacidad para fabricarse en una variedad de tamaños y formas [29].
2. Además, se buscará determinar las constantes de afinidad del SLAP_{TAG} a estos nuevos soportes de quitosano mediante resonancia de plasmón superficial, y se procederá a compararlas con la afinidad de la Bio-Matrix.
3. Con el objetivo de posibilitar diferentes formatos de presentación de la Bio-Matrix se procederá a evaluar otras condiciones de formación de esponjas de poliuretano con bacterias inmovilizadas que permitan matrices porosas en forma de columna.
4. Para ampliar el espectro de sistemas de expresión habilitados para el uso de SAC, se ensayarán la expresión y purificación de proteínas en células de insecto (mediante baculovirus) fusionadas al SLAP_{TAG}, generándose las herramientas necesarias para tal fin.

5. Asimismo, se analizará la generación de vectores de expresión para SLAP_{TAG} que permitan la fusión a inteínas de modo que se logre el clivaje de la etiqueta molecular con métodos no enzimáticos, como el propuesto en esta tesis (SLAP_{ASE}).
6. Se procederá a generar anticuerpos monoclonales anti SLAP_{TAG}, herramienta auxiliar de detección que permite fortalecer el kit de purificación.
7. Se evaluará el uso del SLAP_{TAG} para inmovilizar enzimas de interés industrial. Entre ellas, se ensayará la expresión de la proteína A y proteína G fusionadas al SLAP_{TAG}.
8. Se evaluarán las características catiónicas del SLAP_{TAG} como segunda opción para la purificación o enriquecimiento de proteínas unidas a SLAP_{TAG} por cromatografía de intercambio catiónico complementaria a la cromatografía de afinidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CEPAS Y PLÁSMIDOS

Cepas		
<i>E. coli</i> DH5 α	F- ϕ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1</i> <i>hsdR17</i> (rK-, mK+) <i>phoA supE44</i> λ - <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21 Codon plus	[<i>ompT hsdS</i> (rB- mB-) <i>dcm</i> + Tcr <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA Hte Cmr</i>]	Stratagen
<i>B. subtilis</i>	Wild type strain var. <i>natto</i>	ATCC 15245
<i>Pichia pastoris</i>	<i>P. pastoris</i> strain GS115	BioRad, USA
Plásmidos		
pET28-eGFP-SlpA	Vector que porta el gen de GFP de <i>Aequorea victoria</i> [111] fusionado a SLAP _{TAG}	
pET22-eGFP-SlpA	Vector que porta el gen de GFP de <i>Aequorea victoria</i> fusionado al sitio de corte de la proteasa SLAPase y al SLAP _{TAG}	Este trabajo
pGEX-SlpA	Vector que porta el gen de GST de <i>Shistosoma japonicum</i> [106] fusionado a SLAP _{TAG}	
pLC3-EITH7-SlpA	Vector que porta los genes EspA-Intimin-Tir de <i>Brucella abortus</i> fusionado a SLAP _{TAG}	[106]
pLC3-Omp19-SlpA	Vector que porta el gen de OMP19 de <i>Brucella abortus</i> fusionado a SLAP _{TAG}	[106]
pLC3-FliC-SlpA	Vector que porta el gen de FliC de <i>Salmonella enterica</i> fusionado a SLAP _{TAG}	[106]
pLC3-Gal8-SlpA	Vector que porta el gen de Gal8 de <i>Mus musculus</i> fusionado a SLAP _{TAG}	[106]
pET28-Lys-SlpA	Vector que porta el gen de Lysozima de <i>Gallus gallus</i> fusionado a SLAP _{TAG}	Este trabajo
pMAL-c5X-HRV3c-SlpA	Vector que porta el gen de la proteasa 3c del Rhinovirus humano tipo 14 fusionado a SLAP _{TAG}	Este trabajo
pGEX-2T-EspA-SlpA	Vector que porta el gen de EspA de <i>E.coli</i> siga-toxigénica fusionado a SLAP _{TAG}	Este trabajo
pPICZalphaB-HRV3c-SlpA	Vector que porta el gen de la proteasa 3c del Rhinovirus humano tipo 14 fusionado a SLAP _{TAG}	Este trabajo
Spike-SlpA	Plásmido SARS-CoV-2 S HexaPro que porta el gen de Spike de SARS-COV2 fusionado a SLAP _{TAG}	Este trabajo
pET29-AG-SLAP	Vector que porta el gen de la proteína de diseño A/G fusionada a SLAP _{TAG}	Este trabajo
pET22b-Vp7-SLAP	Vector que porta el gen de Vp7 del virus de la lengua azul fusionado a SLAP _{TAG}	Este trabajo
pET22b-Vp7-His	Vector que porta el gen de Vp7 del virus de la lengua azul fusionado a His _{TAG}	Este trabajo
pET28-Toxoid-SLAP	Vector que porta el gen del toxoide de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica fusionado a SLAP _{TAG}	Este trabajo

pET28-Toxoid	Vector que porta el gen del toxoide de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica fusionado a His _{TAG}	Este trabajo
pLysS	Vector de expresión de T7 lysozyme.	Novagene
pET28-CypA	Vector que porta el gen de CypA de <i>Brucella abortus</i> fusionado a His _{TAG}	[128]
pET28-CypB	Vector que porta el gen de CypB de <i>Brucella abortus</i> fusionado a His _{TAG}	[128]
pET28- CypB ^{R59A/F64A}	Vector que porta el gen de CypB ^{R59A/F64A} de <i>Brucella abortus</i> fusionado a His _{TAG}	[128]

Tabla 6: Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este estudio.

2. CONDICIONES DE CULTIVO

Las cepas de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* se cultivaron en medio Luria Bertani (LB) (Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos) a 37°C 180 rpm. Los vectores bacterianos se transformaron en *E. coli* DH5α para la clonación o *E. coli* BL21 (DE3) para la expresión de proteínas. *Pichia pastoris* se cultivó en medio extracto de levadura-peptona-dextrosa (YPD) a 28°C 180 rpm. Las células HEK293F se cultivaron y mantuvieron a 0.5–3.0 × 10⁶ células/ml en una incubadora de agitador de plataforma de CO₂ humidificada a 37 °C en el Medio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM - ThermoFisher).

3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Las Técnicas de Biología Molecular se realizaron según Sambrook y Maniatis [167] y las instrucciones de los fabricantes.

4. CLONACIÓN

El gen de la lisozima se amplificó a partir de pLys con primers de oligonucleótidos Fw-lys-NdeI (CCCATATGGCTCGTGACAGTTTAAACAACGTG) y Rv-lys-Sall (CGGTCGACTCCACGGTCAGAAGTGACCAGTTTCG). El producto de PCR se digirió con NdeI y Sall y luego se clonó en el vector pLC3-EITH7-SlpA entre los sitios de restricción de NdeI y Sall. El plásmido recombinante se amplificó por transformación en *E. coli* DH5α.

Finalmente, el gen de la lisozima se subclonó en pET28-eGFP-SlpA entre los sitios de restricción *NdeI* y *NotI* y se transformó en *E. coli* BL21 por electroporación.

El gen *EspA* se amplificó con los siguientes primers: *pRvEspAXbaI* (GCTCTAGATTTACCAAGGGATATTGCTG) y *pFwEITSaII* (ACGCGTCGACGATATGAATGAGGCATCTAAA). Después de la restricción con *XbaI* y *SaII*, el gen fue clonado en *pGEX-SlpA*, que fue previamente digerido con las mismas enzimas. El plásmido se introdujo por electroporación en *E. coli* BL21.

El gen *hrv-3c-slap_{tag}* fue sintetizado en pMAL-c5X y pPICZalfa B para la expresión de proteínas en *E. coli* y *P. pastoris* respectivamente (Gene Universal).

Para la transformación de *P. pastoris* GS115, 5ug de plásmido pPICZalfa B – *hrv-3c* se linealizó con la enzima de restricción *SaI* y se transformó en células a través de electroporación utilizando cubetas de 2 mm (1500 V, 125 X, 50 IF). Las células transformadas fueron seleccionadas por sembrado en medio YPD que contenía Zeocina (100ug/ml) para la selección por resistencia. Las colonias se cultivaron luego en tubos de ensayo de vidrio que contenían caldo YPD y después de 24 h, los cultivos se indujeron agregando 1% (v/v) de metanol puro cada 24 h. Los sobrenadantes fueron muestreados después de 72 h de inducción y los mejores productores fueron elegidos para experimentos adicionales.

pET28-eGFP-SLAP se amplificó y la secuencia *slap_{tag}* se subclonó en el plásmido SARS-CoV-2 S HexaPro (Addgene#154754) entre los sitios de restricción *BamHI* y *XhoI*.

El gen de la proteína A/G fue sintetizado fusionado al SLAP_{TAG} en el vector pET29 entre los sitios de restricción *NdeI/XhoI* (Gene Universal).

El gen del toxoide de *E. coli* se sintetizó en el vector pET28a(+). El plásmido pET28-Lys-SlpA fue amplificado y la secuencia del SLAP_{TAG} fue subclonada en fase entre los sitios de restricción *EcoRI/HindIII* del vector pET28a-Toxoid

El gen correspondiente a VP7 se sintetizó en fase con SLAP_{TAG} (Gene Universal) con sitios de restricción cohesivos (*SaII/XhoI*) en los extremos de la etiqueta. En el extremo 5' se

añadió la secuencia correspondiente al His_{TAG}. El vector fue amplificado y se lo digirió con las enzimas mencionadas para quitar el SLAP_{TAG} conservando el His_{TAG}.

5. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

E. coli BL21 se cultivaron a 37°C 180 rpm en LB líquido suplementado con antibióticos hasta alcanzar OD₆₀₀ = 0,6. Luego, se agregaron 0.1mM IPTG, cultivándose las bacterias durante otras 20 horas a 18°C 180 rpm. Finalmente, las bacterias fueron cosechadas y lisadas por sonicación. Los lisados fueron centrifugados para su clarificación.

La expresión de proteínas en *Pichia pastoris* fue inducida con metanol. Brevemente, los cultivos de *P. pastoris* se cultivaron en 50 ml de YPD durante 48 hs. hasta que se consumió la dextrosa. Luego, se suministraron pulsos de metanol de 200 µl cada 24 horas durante 5 días. Finalmente, *P. pastoris* fue cosechada y los sobrenadantes recolectados.

Las células HEK se transfectaron utilizando polietilenimina (PEI) para la expresión de proteínas. Brevemente, se sembraron 30000 células por well en placas de 24 wells y se incubaron a 37 °C, 5% de CO₂ durante 24 hs. Para la transfección, 4 µl de PEI se diluyeron en 40 µl de DMEM. Se agregaron 500 ng de ADN y la mezcla de transfección se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego, la mezcla de transfección se transfirió a las células y se incubó durante 48 hs. Finalmente, se recolectó el sobrenadante para verificar la expresión de la proteína.

6. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CON HIS_{TAG}: IMAC

La purificación de las proteínas marcadas con His_{TAG} se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, las columnas de mesada se equilibraron con buffer (NaCl 200mM, Tris-Hcl 50mM pH 7.5). Las columnas fueron cargadas con clarificados de extractos bacterianos. Después de ser lavadas, las columnas se eluyeron en pasos con 10, 50, 100, 300 y 500 mM de imidazol diluido en buffer de equilibrado.

7. PREPARACIÓN DE BIO-MATRIX

B. subtilis se crecieron en 200 mL de caldo Luria-Bertani a 37°C 180 rpm durante 48 hs. Luego, el cultivo se centrifugó y las bacterias se lavaron dos veces con PBS. El cultivo se resuspendió en PBS con glutaraldehído al 2% y se incubó durante la noche con agitación suave. A continuación, las bacterias fijadas se lavaron dos veces con PBS y se almacenaron en etanol al 20%. Se estandarizó la Bio-Matrix concentrando hasta alcanzar una $OD_{600} = 30/ml$, aproximadamente 3×10^9 bacterias/ml.

8. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS CON SLAP_{TAG}

Para purificar las proteínas marcadas con SLAP, la Bio-Matrix se equilibró en buffer (200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5). Luego, las muestras se incubaron con la Bio-Matrix en tiempos y temperaturas correspondiente para cada experimento. Las muestras se centrifugaron (8000 rpm) y la Bio-Matrix se lavó 3 veces con buffer de equilibrado. Finalmente, las muestras se incubaron en tiempos y temperaturas con la solución correspondiente para la elución. Las proteínas expresadas en HEK293 y *P. pastoris* fueron purificadas del sobrenadante con el protocolo final descrito en esta tesis.

9. ESTABILIDAD DE LA BIO-MATRIX EN EL TIEMPO Y REUTILIZACIÓN

Para analizar la estabilidad en el tiempo, alícuotas de BM se congelaron a -20°C. En diferentes momentos, las muestras se descongelaron y se utilizaron para purificar GFP-SLAP siguiendo el protocolo desarrollado en este documento.

Para analizar la reutilización, se utilizó una alícuota de BM para purificar GFP-SLAP siguiendo el protocolo desarrollado en este trabajo. Después de la elución, el BM se lavó con dos volúmenes de buffer de elución (buffer bicarbonato pH 10, 200 mM NaCl) y luego dos volúmenes de buffer de pegado (200 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5). El proceso de limpieza se repitió después de cada elución.

10. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

Las muestras de proteínas se disolvieron en buffer de craqueo y se incubaron durante 5 min a 100°C. La electroforesis de proteínas se realizó a 120V en gel SDS-PAGE al 12%. Los geles se tiñeron en una solución de Coomassie-Blue (20% de metanol, 10% de ácido acético).

Para el análisis de Western Blot, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 55 min a 15V utilizando una unidad de transferencia de electroblotting semiseca (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos). Las membranas se incubaron durante 1 hora con buffer de bloqueo (1% de leche descremada seca, 0,1% Tween en PBS). Luego, las membranas se incubaron durante 1 hora con anticuerpo primario diluido en buffer de bloqueo (1/500). Después del lavado con PBS-0,1% Tween, las membranas se incubaron durante 1 hora con anticuerpos secundarios marcados con fluoróforos IRDye (LI-COR, Lincoln, NE, Estados Unidos) diluidos en buffer de bloqueo (1/20000). Finalmente, las membranas se escanearon utilizando el Odyssey Imaging System (LI-COR).

Las proteínas se cuantificaron con el espectrómetro UV-Vis NanoDrop One (Thermo Scientific)

11. MEDICIONES DE FLUORESCENCIA

Las mediciones de fluorescencia GFP se realizaron a una longitud de onda de emisión y de excitación de 485/535 nm respectivamente utilizando el lector de microplacas FilterMax F5 en placas negras de 96-well (Thermo).

12. MODELADO DE PROTEÍNAS

La estructura de GFP-SLAP_{tag} fue predicha por AlphaFold (Jumper et al., 2021). Se empleó la interfaz de la web colabFold utilizando configuraciones estándar (cinco modelos y ninguna plantilla).

13. ISOTERMA DE ADSORCIÓN

Las isotermas de adsorción para GFP-SLAP_{tag} en Bio-Matrix se realizaron mediante experimentos por lotes. BM se equilibró previamente con el buffer de equilibrio Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM y pH 7.6. Se utilizó proteína GFP-SLAP_{tag} purificada (3 mg/ml) dializada contra el mismo buffer como solución madre. Se incubaron diferentes concentraciones de proteína con 10 µl de BM. Después de alcanzar el equilibrio, las muestras se centrifugaron y se midió la fluorescencia GFP del sobrenadante. La concentración de proteínas no absorbidas en equilibrio con la BM se calculó utilizando la fluorescencia GFP. Los datos de isoterma de adsorción se ajustaron a la ecuación de isoterma de Langmuir para calcular los parámetros Q_{max} y K_D .

14. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA CONFOCAL

Las muestras se incubaron durante 30 min en placas tratadas con poli-L-lisina (Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos). Después de ser tratadas con paraformaldehído (PFA 4% en PBS), las muestras se lavaron dos veces con PBS. Finalmente, se observaron las muestras en un microscopio de barrido láser confocal Olympus FV1000 utilizando un objetivo de aceite PlanApo N (60 × 1.42 NA).

15. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD PPIASA

La determinación de la actividad PPIasa de las ciclofilinas recombinantes se realizó como se describe en (Mares et al., 2011). En resumen, se preparó una solución de Proteína Fluorescente Verde (H₆-GFP-SLAP_{TAG}) desnaturalizada por ácido a una concentración de 5 µM diluyendo 10 µM de solución de GFP en buffer de desnaturalización (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) con un volumen igual de solución de HCl de 125 mM. La mezcla se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente, verificando la desnaturalización con medidas de fluorescencia. Luego, la solución de GFP desnaturalizada a 2.5 µM se diluyó 1:100 en buffer de plegamiento (25 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) en ausencia o presencia de 2 µM de ciclofilinas. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 200 µl a temperatura ambiente, midiendo la fluorescencia durante 20

minutos en el espectrómetro FilterMax F5 a longitudes de onda de excitación de 485 nm y emisión de 538 nm.

16. CLIVAJE DE SLAP_{TAG} CON PROTEASA HRV

Se preparo buffer de clivaje recomendado para las versiones comerciales de la enzima: 50 mM Tris-HCl, pH 7.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol. Proteínas fusionadas a SLAP_{TAG} se adhirieron a la Bio-Matrix. Se lavó la muestra y se agregó buffer de clivaje previamente enfriado a 4°C. Se agregó la proteasa HRV-SLAP_{TAG} y se incubó a 4°C. Se recuperaron los percolados conteniendo las proteínas sin SLAP_{TAG}.

17. TINCIÓN CON CRISTAL VIOLETA

El soporte (miniesferas de polipropileno o impresos 3D) se incubó con una solución de cristal violeta 0,1% durante 20 minutos. Luego se descartó la solución de cristal violeta y se lavó con PBS 1X.

Para cuantificar y comparar la adhesión bacteriana sobre el soporte, se eluyó el colorante agregando 2 ml de una solución de Etanol:Acetona (80:20 v/v) durante 20 minutos. Seguidamente, se midió la absorbancia del eluído a 590 nm.

18. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE HIERRO

Se sintetizaron nanopartículas de hierro por co-precipitación reversa como describe Nadi et al, 2018. En síntesis, se preparó el precursor disolviendo 0.89 g de FeCl₂·4H₂O en 90 mL de agua. Se incubó en agitación por 15 min y se sonicó por 10 min para asegurar la completa disolución de la sal. La solución, luego, se volcó sobre una solución de hidróxido de amonio diluida al medio con agua y se mantuvo en agitación durante una hora. Finalmente se lavó repetidas veces con agua deionizada.

19. GENERACIÓN DE BIO-MATRIX MAGNÉTICA

Se procedió según lo descrito por Nadi et al, 2018. Se resuspendieron 5 ml de Bio-Matrix en PBS y se agregaron nanoparticulas de hierro en una concentración final de 40 g/L. Se

mezcla con agitación suave durante 30 minutos. Se lavó repetidas veces con PBS 1X y se conservó en etanol 20%.

20. GENERACIÓN DE ESPONJAS DE PUF

Para la generación de las esponjas se siguió el protocolo del vendedor. Se mezclaron partes iguales de X e Y (volumen final 200 μ l) sobre 50 μ l de PBS que contenían 1.10^9 bacterias. Se esperaron 10 minutos hasta que finalizara completamente la reacción de polimerización

21. IMPRESOS 3D DE POLI(HIDROXIBUTIRATO-CO-HIDROXIVALERATO)

Los diferentes impresos 3D fueron facilitados generosamente por el Dr. Marcos Bertuola y la Dra. Beatriz Araoz.

22. BOLITAS DE POLIPROPILENO

Las bolitas fueron generosamente donadas por GAMA plásticos S.A.

23. MATRICES DE QUITINA Y QUITOSANO

Las diferentes matrices de quitina y quitosano fueron provistas generosamente por el Instituto de Nanobiotecnología (NANOBIOTEC) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

24. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS

Los ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal con 10 μ g de GST-SLAP pura con hidróxido de aluminio (Imject Alum ThermoFisher). A los 15 y 30 días, se realizó un refuerzo con 5 μ g de proteína. Una semana luego de la última inmunización los ratones se sangraron y el suero fue guardado a -20°C para su posterior uso.

Los anticuerpos anti GFP fueron generosamente facilitados por el Dr. Juan Mucci.

25. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 9. La significación estadística fue analizada por ANOVA unidireccional con Bonferroni.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. Puetz and F. M. Wurm, 'Recombinant Proteins for Industrial versus Pharmaceutical Purposes: A Review of Process and Pricing', *Processes* 2019, Vol. 7, Page 476, vol. 7, no. 8, p. 476, Jul. 2019, doi: 10.3390/PR7080476.
- [2] N. E. Labrou, 'Protein Purification Technologies', *Methods Mol Biol*, vol. 2178, pp. 3–10, 2021, doi: 10.1007/978-1-0716-0775-6_1.
- [3] S. T. Park and J. Kim, 'Trends in Next-Generation Sequencing and a New Era for Whole Genome Sequencing', *Int Neurourol J*, vol. 20, no. Suppl 2, p. S76, 2016, doi: 10.5213/INJ.1632742.371.
- [4] J. Shendure and E. L. Aiden, 'The expanding scope of DNA sequencing', *Nat Biotechnol*, vol. 30, no. 11, pp. 1084–1094, Nov. 2012, doi: 10.1038/NBT.2421.
- [5] M. Saraswat, L. Musante, A. Ravidá, B. Shortt, B. Byrne, and H. Holthofer, 'Preparative purification of recombinant proteins: Current status and future trends', *BioMed Research International*, vol. 2013. 2013. doi: 10.1155/2013/312709.
- [6] L. A. Palomares, S. Estrada-Mondaca, and O. T. Ramírez, 'Production of recombinant proteins: challenges and solutions.', *Methods Mol Biol*, vol. 267, pp. 15–52, 2004, doi: 10.1385/1-59259-774-2:015/COVER.
- [7] A. Schiermeyer, 'Optimizing product quality in molecular farming', *Curr Opin Biotechnol*, vol. 61, pp. 15–20, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.copbio.2019.08.012.
- [8] D. Gervais, 'Quality Control and Downstream Processing of Therapeutic Enzymes', *Adv Exp Med Biol*, vol. 1148, pp. 55–80, 2019, doi: 10.1007/978-981-13-7709-9_3.
- [9] M. Â. Taipa, P. Fernandes, and C. C. C. R. de Carvalho, 'Production and Purification of Therapeutic Enzymes', *Adv Exp Med Biol*, vol. 1148, pp. 1–24, 2019, doi: 10.1007/978-981-13-7709-9_1.
- [10] P. T. Wingfield, 'Overview of the purification of recombinant proteins', *Curr Protoc Protein Sci*, vol. 80, pp. 6.1.1-6.1.35, 2015, doi: 10.1002/0471140864.PS0601S80.

- [11] B. Kelley, 'Industrialization of mAb production technology: the bioprocessing industry at a crossroads', *MAbs*, vol. 1, no. 5, pp. 443–452, 2009, doi: 10.4161/MABS.1.5.9448.
- [12] G. el Khoury, B. Khogeer, C. Chen, K. T. Ng, S. I. Jacob, and C. R. Lowe, 'Bespoke affinity ligands for the purification of therapeutic proteins', *Pharm Bioprocess*, vol. 3, no. 2, pp. 139–152, Apr. 2015, doi: 10.4155/pbp.14.60.
- [13] B. Owczarek, A. Gerszberg, and K. Hnatuszko-Konka, 'A Brief Reminder of Systems of Production and Chromatography-Based Recovery of Recombinant Protein Biopharmaceuticals', *Biomed Res Int*, vol. 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/4216060.
- [14] S. K. Rasmussen, H. Næsted, C. Müller, A. B. Tolstrup, and T. P. Frandsen, 'Recombinant antibody mixtures: production strategies and cost considerations', *Arch Biochem Biophys*, vol. 526, no. 2, pp. 139–145, Oct. 2012, doi: 10.1016/J.ABB.2012.07.001.
- [15] D. G. Greene *et al.*, 'Mechanisms of precipitate formation during the purification of an Fc-fusion protein', *Biotechnol Bioeng*, vol. 115, no. 10, p. 2489, Oct. 2018, doi: 10.1002/BIT.26746.
- [16] F. W. F. Wong, A. B. Ariff, and D. C. Stuckey, 'Downstream protein separation by surfactant precipitation: a review', <http://dx.doi.org/10.1080/07388551.2017.1312266>, vol. 38, no. 1, pp. 31–46, Jan. 2017, doi: 10.1080/07388551.2017.1312266.
- [17] F. Hofmeister, 'Zur Lehre von der Wirkung der Salze - Zweite Mittheilung', *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, vol. 24, no. 4–5, pp. 247–260, 1888, doi: 10.1007/BF01918191/METRICS.
- [18] H. Lai *et al.*, 'Effect of Hofmeister series anions on freeze-thaw stability of emulsion stabilized with whey protein isolates', *Food Hydrocoll*, vol. 134, p. 108015, Jan. 2023, doi: 10.1016/J.FOODHYD.2022.108015.

- [19] E. J. Cohn, J. T. Edsall, J. G. Kirkwood, H. Mueller, J. L. ONCLEY, and G. SCATCHARD, 'Proteins, amino acids and peptides as Ions and Dipolar Ions', *Am J Med Sci*, vol. 205, no. 6, p. 884, Jun. 1943, doi: 10.1097/00000441-194306000-00035.
- [20] E. J. Cohn *et al.*, 'Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. IV. A System for the Separation into Fractions of the Protein and Lipoprotein Components of Biological Tissues and Fluids', *J Am Chem Soc*, vol. 68, no. 3, pp. 459–475, Mar. 1946, doi: 10.1021/JA01207A034/ASSET/JA01207A034.FP.PNG_V03.
- [21] C. A. Lucy, 'Evolution of ion-exchange: from Moses to the Manhattan Project to modern times', *J Chromatogr A*, vol. 1000, no. 1–2, pp. 711–724, Jun. 2003, doi: 10.1016/S0021-9673(03)00528-4.
- [22] Tswett M, 'The chemistry of chlorophyll, phylloxanthin, phyllocyanin, and chlorophyllane.', *Biochem Z*, vol. 5, pp. 6–32, 1907.
- [23] I. M. Hais, 'Biospecific sorption, Prague, 1910: Emil Starkenstein (1884–1942)', *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, vol. 376, no. C, pp. 5–9, Apr. 1986, doi: 10.1016/S0378-4347(00)80820-8.
- [24] Starkenstein E, 'Ferment action and the influence upon it of neutral salts', *Biochem Z* 24, pp. 210–218, 1910.
- [25] D. S. Hage and R. Matsuda, 'Affinity chromatography: a historical perspective', *Methods Mol Biol*, vol. 1286, 2015, doi: 10.1007/978-1-4939-2447-9_1.
- [26] J. H. Northrop, 'CRYSTALLINE PEPSIN : VI. INACTIVATION BY BETA AND GAMMA RAYS FROM RADIUM AND BY ULTRA-VIOLET LIGHT', *J Gen Physiol*, vol. 17, no. 3, p. 359, Jan. 1934, doi: 10.1085/JGP.17.3.359.
- [27] N. H. Grant and K. C. Robbins, 'Studies on porcine elastase and proelastase', *Arch Biochem Biophys*, vol. 66, no. 2, pp. 396–403, Feb. 1957, doi: 10.1016/S0003-9861(57)80015-0.

- [28] Landsteiner K, 'Specific serum reactions induced by the addition of substances of known constitution (organic acids), XVI: antigens and serological specificity', *Biochem Z*, vol. 104, pp. 280–299, 1920.
- [29] E. L. Rodriguez *et al.*, 'Affinity chromatography: A review of trends and developments over the past 50 years', *Journal of Chromatography B*, vol. 1157, p. 122332, Nov. 2020, doi: 10.1016/J.JCHROMB.2020.122332.
- [30] P. Cuatrecasas, M. Wilchek, and C. B. Anfinsen, 'Selective enzyme purification by affinity chromatography.', *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 61, no. 2, pp. 636–643, 1968, doi: 10.1073/PNAS.61.2.636.
- [31] J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, and G. Belfrage, 'Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation', *Nature*, vol. 258, no. 5536, pp. 598–599, 1975, doi: 10.1038/258598A0.
- [32] G. E. J. Staal, J. F. Koster, H. Kamp, L. Van Milligen-Boersma, and C. Veeger, 'Human erythrocyte pyruvate kinase. Its purification and some properties', *Biochim Biophys Acta*, vol. 227, no. 1, pp. 86–96, Jan. 1971, doi: 10.1016/0005-2744(71)90170-7.
- [33] H. L. Weith, J. L. Wiebers, and P. T. Gilham, 'Synthesis of cellulose derivatives containing the dihydroxyboryl group and a study of their capacity to form specific complexes with sugars and nucleic acid components', *Biochemistry*, vol. 9, no. 22, pp. 4396–4401, Oct. 1970, doi: 10.1021/BI00824A021.
- [34] I. Mus-Veteau, 'Heterologous expression and purification systems for structural proteomics of mammalian membrane proteins', *Comp Funct Genomics*, vol. 3, no. 6, pp. 511–517, Dec. 2002, doi: 10.1002/CFG.218.
- [35] J. Zhu and D. Hatton, 'New mammalian expression systems', *Adv Biochem Eng Biotechnol*, vol. 165, pp. 9–50, 2018, doi: 10.1007/10_2016_55.

- [36] R. Baghban *et al.*, 'Yeast Expression Systems: Overview and Recent Advances', *Mol Biotechnol*, vol. 61, no. 5, pp. 365–384, May 2019, doi: 10.1007/s12033-019-00164-8.
- [37] K. Terpe, 'Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems', *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 72, no. 2, pp. 211–222, Sep. 2006, doi: 10.1007/s00253-006-0465-8.
- [38] E. Łojewska, T. Kowalczyk, ... S. O.-P. E. and, and undefined 2016, 'Extraction and purification methods in downstream processing of plant-based recombinant proteins', *Elsevier*, vol. 120, pp. 110–117, 2016, doi: 10.1016/j.pep.2015.12.018.
- [39] C. Oliveira, L. D.-A. microbiology and biotechnology, and undefined 2018, 'Guidelines to reach high-quality purified recombinant proteins', *Springer*, Accessed: Jan. 23, 2023. [Online]. Available: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-017-8623-8>
- [40] GE Bioscience, 'Affinity Chromatography: principles and methods', 2007.
- [41] S. Arora, V. Saxena, and B. A. Methods, 'Affinity chromatography: A versatile technique for antibody purification', *Elsevier*, 2017, Accessed: Jan. 23, 2023. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202316304923>
- [42] D. Hage, *Handbook of Affinity Chromatography*, Second. CRC Press, 2006. doi: 10.1201/9780824751982.
- [43] R. R. Walters, 'Affinity Chromatography', *Anal Chem*, vol. 57, no. 11, Jan. 1985, doi: 10.1021/AC00288A001/ASSET/AC00288A001.FP.PNG_V03.
- [44] J. Turková, 'Affinity chromatography', *Elsevier*, 1978, Accessed: Jan. 23, 2023. [Online]. Available: https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=-v9NQ0GH18kC&oi=fnd&pg=PP1&ots=-aLNru3_2c&sig=CT4nYn4rsZAkV9HFwPGgYqCCHSA

- [45] R. Freitag and C. Horváth, 'Chromatography in the downstream processing of biotechnological products', *Adv Biochem Eng Biotechnol*, vol. 53, pp. 17–59, 1996, doi: 10.1007/BFB0102324.
- [46] M. Kalyanpur, 'Downstream processing in the biotechnology industry', *Mol Biotechnol*, vol. 22, no. 1, pp. 87–98, 2002, doi: 10.1385/MB:22:1:087.
- [47] J. J. Milne, 'Scale-Up of Protein Purification: Downstream Processing Issues', *Methods Mol Biol*, vol. 1485, pp. 71–84, 2017, doi: 10.1007/978-1-4939-6412-3_5.
- [48] A. S. Pina *et al.*, 'A tailor-made "tag-receptor" affinity pair for the purification of fusion proteins', *ChemBioChem*, vol. 15, no. 10, pp. 1423–1435, Jul. 2014, doi: 10.1002/cbic.201400018.
- [49] N. Singh and S. Herzer, 'Downstream processing technologies/capturing and final purification: Opportunities for innovation, change, and improvement. A review of downstream processing developments in protein purification', *Adv Biochem Eng Biotechnol*, vol. 165, pp. 115–178, 2018, doi: 10.1007/10_2017_12.
- [50] C. Zhang *et al.*, 'High performance affinity chromatography and related separation methods for the analysis of biological and pharmaceutical agents', *Analyst*, vol. 143, no. 2, pp. 374–391, Jan. 2018, doi: 10.1039/C7AN01469D.
- [51] A. M. G. C. Dias and A. C. A. Roque, 'The future of protein scaffolds as affinity reagents for purification', *Biotechnol Bioeng*, vol. 114, no. 3, pp. 481–491, Mar. 2017, doi: 10.1002/BIT.26090.
- [52] D. W. Wood, 'New trends and affinity tag designs for recombinant protein purification', *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 26, no. 1. Elsevier Ltd, pp. 54–61, 2014. doi: 10.1016/j.sbi.2014.04.006.
- [53] A. S. Pina, Í. L. Batalha, and A. C. A. Roque, 'Affinity tags in protein purification and peptide enrichment: An overview', *Methods in Molecular Biology*, vol. 1129, pp. 147–168, 2014, doi: 10.1007/978-1-62703-977-2_14/COVER.

- [54] I. T. Sousa and M. Â. Taipa, 'Biomimetic affinity ligands for protein purification', *Methods Mol Biol*, vol. 1129, pp. 231–262, 2014, doi: 10.1007/978-1-62703-977-2_20.
- [55] D. S. Waugh, 'An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags', *Protein Expr Purif*, vol. 80, no. 2, pp. 283–293, Dec. 2011, doi: 10.1016/J.PEP.2011.08.005.
- [56] J. Arnau, C. Lauritzen, G. E. Petersen, and J. Pedersen, 'Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins', *Protein Expr Purif*, vol. 48, no. 1, pp. 1–13, Jul. 2006, doi: 10.1016/J.PEP.2005.12.002.
- [57] K. Terpe, 'Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems', *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 60, no. 5, pp. 523–533, 2003, doi: 10.1007/S00253-002-1158-6.
- [58] J. Nilsson, S. Ståhl, J. Lundeberg, M. Uhlén, and P. Å. Nygren, 'Affinity fusion strategies for detection, purification, and immobilization of recombinant proteins', *Protein Expr Purif*, vol. 11, no. 1, pp. 1–16, 1997, doi: 10.1006/PREP.1997.0767.
- [59] R. Burgess and M. Deutscher, *Guide to protein purification*. 2009. Accessed: Jan. 23, 2023. [Online]. Available: <https://books.google.com.ar/books?hl=es&lr=&id=f6Lp4yna4hoC&oi=fnd&pg=PP1&dq=Tagging+for+protein+expression.+In:+Richard+R,+Murray+P&ots=3IMSzKUE0A&sig=IBPWznSKZTBjkNPsoxU1BlogFpU>
- [60] C. J. Huang, H. Lin, and X. Yang, 'Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements', *J Ind Microbiol Biotechnol*, vol. 39, no. 3, pp. 383–399, Mar. 2012, doi: 10.1007/S10295-011-1082-9.
- [61] B. A. Baldo, 'Chimeric Fusion Proteins Used for Therapy: Indications, Mechanisms, and Safety', *Drug Saf*, vol. 38, no. 5, pp. 455–479, May 2015, doi: 10.1007/S40264-015-0285-9.

- [62] E. Hochuli, H. Döbeli, and A. Schacher, 'New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues', *J Chromatogr A*, vol. 411, no. C, pp. 177–184, Jan. 1987, doi: 10.1016/S0021-9673(00)93969-4.
- [63] T. T. Yip and T. W. Hutchens, 'Immobilized metal-ion affinity chromatography.', *Methods Mol Biol*, vol. 244, pp. 179–190, 2004, doi: 10.1385/1-59259-655-X:179/TABLES/1.
- [64] H. Block *et al.*, 'Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): A Review', *Methods Enzymol*, vol. 463, no. C, pp. 439–473, Jan. 2009, doi: 10.1016/S0076-6879(09)63027-5.
- [65] C. L. Young, Z. T. Britton, and A. S. Robinson, 'Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications', *Biotechnol J*, vol. 7, no. 5, pp. 620–634, May 2012, doi: 10.1002/BIOT.201100155.
- [66] L. Peng *et al.*, 'High-level secretory production of recombinant bovine enterokinase light chain by *Pichia pastoris*', *J Biotechnol*, vol. 108, no. 2, pp. 185–192, Mar. 2004, doi: 10.1016/J.JBIOTECH.2003.11.004.
- [67] H. Nam, B. J. Hwang, D. Y. Choi, S. Shin, and M. Choi, 'Tobacco etch virus (TEV) protease with multiple mutations to improve solubility and reduce self-cleavage exhibits enhanced enzymatic activity', *FEBS Open Bio*, vol. 10, no. 4, pp. 619–626, Apr. 2020, doi: 10.1002/2211-5463.12828.
- [68] R. Ullah *et al.*, 'Activity of the Human Rhinovirus 3C Protease Studied in Various Buffers, Additives and Detergents Solutions for Recombinant Protein Production', *PLoS One*, vol. 11, no. 4, Apr. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0153436.
- [69] R. J. Jenny, K. G. Mann, and R. L. Lundblad, 'A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa', *Protein Expr Purif*, vol. 31, no. 1, pp. 1–11, Sep. 2003, doi: 10.1016/S1046-5928(03)00168-2.

- [70] Y. Li, N. Varejão, and D. Reverter, 'Structural basis for the SUMO protease activity of the atypical ubiquitin-specific protease USPL1', *Nature Communications* 2022 13:1, vol. 13, no. 1, pp. 1–12, Apr. 2022, doi: 10.1038/s41467-022-29485-0.
- [71] Y. Li, 'Self-cleaving fusion tags for recombinant protein production', *Biotechnol Lett*, vol. 33, no. 5, pp. 869–881, May 2011, doi: 10.1007/S10529-011-0533-8.
- [72] B. A. Fong, W. Y. Wu, and D. W. Wood, 'The potential role of self-cleaving purification tags in commercial-scale processes', *Trends Biotechnol*, vol. 28, no. 5, pp. 272–279, May 2010, doi: 10.1016/J.TIBTECH.2010.02.003.
- [73] M. Amaranto, P. Vaccarello, E. M. E. Correa, J. L. Barra, and A. Godino, 'Novel intein-based self-cleaving affinity tag for recombinant protein production in *Escherichia coli*', *J Biotechnol*, vol. 332, pp. 126–134, May 2021, doi: 10.1016/J.JBIOTEC.2021.04.003.
- [74] H. Mao, 'A self-cleavable sortase fusion for one-step purification of free recombinant proteins', *Protein Expr Purif*, vol. 37, no. 1, pp. 253–263, Sep. 2004, doi: 10.1016/j.pep.2004.06.013.
- [75] L. Sadilkova, R. Osicka, M. Sulc, I. Linhartova, P. Novak, and P. Sebo, 'Single-step affinity purification of recombinant proteins using a self-excising module from *Neisseria meningitidis* FrpC', *Protein Sci*, vol. 17, no. 10, pp. 1834–1843, Oct. 2008, doi: 10.1110/PS.035733.108.
- [76] C. Achmüller *et al.*, 'N(pro) fusion technology to produce proteins with authentic N termini in *E. coli*', *Nat Methods*, vol. 4, no. 12, pp. 1037–1043, Dec. 2007, doi: 10.1038/NMETH1116.
- [77] H. C. Goh, R. M. Sobota, F. J. Ghadessy, and S. Nirantar, 'Going native: Complete removal of protein purification affinity tags by simple modification of existing tags and proteases', *Protein Expr Purif*, vol. 129, pp. 18–24, Jan. 2017, doi: 10.1016/J.PEP.2016.09.001.

- [78] A. G. Woolfork *et al.*, 'Recent Advances in Supramolecular Affinity Separations: Affinity Chromatography and Related Methods', *Adv Chromatogr*, vol. 58, p. 1, Oct. 2021, doi: 10.1201/9781003223405-1.
- [79] P.-E. Gustavsson and P.-O. Larsson, 'Support materials for affinity chromatography', *Handbook of Affinity Chromatography*, pp. 15–33, Jan. 2006.
- [80] C. Arsenis and D. B. McCormick, 'Purification of Liver Flavokinase by Column Chromatography on Flavin-Cellulose Compounds', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 239, no. 9, pp. 3093–3097, Sep. 1964, doi: 10.1016/S0021-9258(18)93857-3.
- [81] D. H. Campbell, E. Luescher, and L. S. Lerman, 'Immunologic Adsorbents', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 37, no. 9, pp. 575–578, Sep. 1951, doi: 10.1073/PNAS.37.9.575.
- [82] M. F. Baieli, N. Urtasun, M. v. Miranda, O. Cascone, and F. J. Wolman, 'Efficient wheat germ agglutinin purification with a chitosan-based affinity chromatographic matrix', *J Sep Sci*, vol. 35, no. 2, pp. 231–238, 2012, doi: 10.1002/jssc.201100730.
- [83] D. B. Hirsch *et al.*, 'Lactoferrin purification and whey protein isolate recovery from cheese whey using chitosan mini-spheres', *Int Dairy J*, vol. 109, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.idairyj.2020.104764.
- [84] S. Khodaei *et al.*, 'Covalent Immobilization of Protein A on Chitosan and Aldehyde Double-Branched Chitosan as Biocompatible Carriers for Immunoglobulin G (Igg) Purification', *J Chromatogr Sci*, vol. 56, no. 10, pp. 933–940, Nov. 2018, doi: 10.1093/CHROMSCI/BMY070.
- [85] M. Leite Pereira *et al.*, 'Purification of a chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seeds with potential to relieve pain and inflammation', *Protein Pept Lett*, vol. 18, no. 11, pp. 1078–1085, Aug. 2011, doi: 10.2174/092986611797200959.
- [86] B. M. Veeregowda and V. Balamurugan, 'An Overview of Heterologous Expression Host Systems for the Production of Recombinant Proteins', *Advances in Animal and Veterinary Sciences* 4(7), pp. 346–356, 2016.

- [87] A. Singh, V. Upadhyay, A. K. Upadhyay, S. M. Singh, and A. K. Panda, 'Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process', *Microb Cell Fact*, vol. 14, no. 1, pp. 1–10, Mar. 2015, doi: 10.1186/S12934-015-0222-8/TABLES/3.
- [88] D. C. Andersen and L. Krummen, 'Recombinant protein expression for therapeutic applications', *Curr Opin Biotechnol*, vol. 13, no. 2, pp. 117–123, Apr. 2002, doi: 10.1016/S0958-1669(02)00300-2.
- [89] R. J. Solá and K. Griebenow, 'Glycosylation of therapeutic proteins: an effective strategy to optimize efficacy', *BioDrugs*, vol. 24, no. 1, pp. 9–21, 2010, doi: 10.2165/11530550-000000000-00000.
- [90] M. v. Dilworth *et al.*, 'Microbial expression systems for membrane proteins', *Methods*, vol. 147, pp. 3–39, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.ymeth.2018.04.009.
- [91] D. L. Jarvis, 'Baculovirus-insect cell expression systems', *Methods Enzymol*, vol. 463, no. C, pp. 191–222, 2009, doi: 10.1016/S0076-6879(09)63014-7.
- [92] D. Richardson, J. Itkonen, J. Nievas, A. Urtti, and M. G. Casteleijn, 'Accelerated pharmaceutical protein development with integrated cell free expression, purification, and bioconjugation', *Sci Rep*, vol. 8, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/S41598-018-30435-4.
- [93] C. J. Sullivan *et al.*, 'A cell-free expression and purification process for rapid production of protein biologics', *Biotechnol J*, vol. 11, no. 2, pp. 238–248, Feb. 2016, doi: 10.1002/BIOT.201500214.
- [94] K. Tran *et al.*, 'Cell-free production of a therapeutic protein: Expression, purification, and characterization of recombinant streptokinase using a CHO lysate', *Biotechnol Bioeng*, vol. 115, no. 1, pp. 92–102, Jan. 2018, doi: 10.1002/BIT.26439.

- [95] C. Madhurantakam, S. Howorka, and H. Remaut, 'S-layer structure in *bacteria* and *archaea*', in *Nanomicrobiology: Physiological and Environmental Characteristics*, Springer New York, 2014, pp. 11–37. doi: 10.1007/978-1-4939-1667-2_2.
- [96] U. B. Sleytr and T. J. Beveridge, 'Bacterial S-layers', *Trends Microbiol*, vol. 7, no. 6, pp. 253–260, Jun. 1999, doi: 10.1016/S0966-842X(99)01513-9.
- [97] R. P. Fagan and N. F. Fairweather, 'Biogenesis and functions of bacterial S-layers', *Nature Reviews Microbiology*, vol. 12, no. 3. pp. 211–222, Mar. 2014. doi: 10.1038/nrmicro3213.
- [98] U. B. Sleytr, B. Schuster, E. M. Egelseer, and D. Pum, 'S-layers: Principles and applications', *FEMS Microbiol Rev*, vol. 38, no. 5, pp. 823–864, Sep. 2014, doi: 10.1111/1574-6976.12063.
- [99] D. Pum and U. B. Sleytr, 'The application of bacterial S-layers in molecular nanotechnology', 1999.
- [100] T. J. Beveridge and S. F. Koval, *Advances in Bacterial Paracrystalline Surface Layers*. NATO Science Series, 1993.
- [101] N. Ilk, E. M. Egelseer, and U. B. Sleytr, 'S-layer fusion proteins-construction principles and applications', *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 22, no. 6. pp. 824–831, Dec. 2011. doi: 10.1016/j.copbio.2011.05.510.
- [102] B. Schuster and U. B. Sleytr, 'Biomimetic interfaces based on S-layer proteins, lipid membranes and functional biomolecules', *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 11, no. 96. Royal Society, Jul. 06, 2014. doi: 10.1098/rsif.2014.0232.
- [103] E. M. Egelseer *et al.*, 'S-Layers, Microbial, Biotechnological Applications', *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*, pp. 1–25, Dec. 2009, doi: 10.1002/9780470054581.EIB546.

- [104] U. B. Sleytr *et al.*, 'Nanobiotechnology with S-layer proteins as building blocks', *Prog Mol Biol Transl Sci*, vol. 103, pp. 277–352, 2011, doi: 10.1016/B978-0-12-415906-8.00003-0.
- [105] E. M. Egelseer, M. Sára, D. Pum, B. Schuster, and U. B. Sleytr, 'Genetically engineered S-layer proteins and s-layer-specific heteropolysaccharides as components of a versatile molecular construction kit for applications in nanobiotechnology', *NanoBioTechnology: BioInspired Devices and Materials of the Future*, pp. 55–86, 2008, doi: 10.1007/978-1-59745-218-2_4/COVER.
- [106] P. J. Uriza *et al.*, 'Development of an Antigen Delivery Platform Using *Lactobacillus acidophilus* Decorated With Heterologous Proteins: A Sheep in Wolf's Clothing Story', *Front Microbiol*, vol. 11, Oct. 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.509380.
- [107] J. S. LeCureux and G. A. Dean, '*Lactobacillus* Mucosal Vaccine Vectors: Immune Responses against Bacterial and Viral Antigens', *mSphere*, vol. 3, no. 3, Jun. 2018, doi: 10.1128/MSPHERE.00061-18.
- [108] S. Lortal, J. van Heijenoort, K. Gruber, and E. B. Sleytr, 'Slayer of *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046: isolation, chemical characterization and re-formation after extraction with lithium chloride', 1992. [Online]. Available: www.microbiologyresearch.org
- [109] E. Smit, F. Oling, R. Demel, B. Martinez, and P. H. Pouwels, 'The S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: Identification and characterisation of domains responsible for S-protein assembly and cell wall binding', *J Mol Biol*, vol. 305, no. 2, pp. 245–257, Jan. 2001, doi: 10.1006/jmbi.2000.4258.
- [110] W. Kong *et al.*, 'Identification and Characterization of Domains Responsible for Cell Wall Binding, Self-Assembly, and Adhesion of S-layer Protein from *Lactobacillus acidophilus* CICC 6074', *J Agric Food Chem*, vol. 70, no. 40, pp. 12982–12989, Oct. 2022, doi: 10.1021/ACS.JAFC.2C03907.

- [111] J. Fina Martin *et al.*, 'Exploring lectin-like activity of the S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356', *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 103, no. 12, pp. 4839–4857, Jun. 2019, doi: 10.1007/S00253-019-09795-Y.
- [112] B. Sahay *et al.*, 'Advancing the use of *Lactobacillus acidophilus* surface layer protein a for the treatment of intestinal disorders in humans', *Gut Microbes*, vol. 6, no. 6, pp. 392–397, Jan. 2015, doi: 10.1080/19490976.2015.1107697.
- [113] B. Johnson, K. Selle, S. O'Flaherty, Y. J. Goh, and T. Klaenhammer, 'Identification of extracellular surface-layer associated proteins in *Lactobacillus acidophilus* NCFM', *Microbiology (Reading)*, vol. 159, no. Pt 11, pp. 2269–2282, Nov. 2013, doi: 10.1099/MIC.0.070755-0.
- [114] H. J. Boot, C. P. A. M. Kolen, J. M. van Noort, and P. H. Pouwels, 'S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: purification, expression in *Escherichia coli*, and nucleotide sequence of the corresponding gene', *J Bacteriol*, vol. 175, no. 19, pp. 6089–6096, 1993, doi: 10.1128/JB.175.19.6089-6096.1993.
- [115] S. Åvall-Jääskeläinen and A. Palva, '*Lactobacillus* surface layers and their applications', *FEMS Microbiol Rev*, vol. 29, no. 3, pp. 511–529, 2005, doi: 10.1016/J.FEMSRE.2005.04.003.
- [116] A. S. Naidu, W. R. Bidlack, and R. A. Clemens, 'Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB)', *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol. 39, no. 1, pp. 13–126, 1999, doi: 10.1080/10408699991279187.
- [117] J. P. Hymes, B. R. Johnson, R. Barrangou, and T. R. Klaenhammer, 'Functional Analysis of an S-Layer-Associated Fibronectin-Binding Protein in *Lactobacillus acidophilus* NCFM', *Appl Environ Microbiol*, vol. 82, no. 9, p. 2676, May 2016, doi: 10.1128/AEM.00024-16.
- [118] B. R. Johnson, S. O'Flaherty, Y. J. Goh, I. Carroll, R. Barrangou, and T. R. Klaenhammer, 'The S-layer Associated Serine Protease Homolog PrtX Impacts Cell

Surface-Mediated Microbe-Host Interactions of *Lactobacillus acidophilus* NCFM', *Front Microbiol*, vol. 8, no. JUN, Jun. 2017, doi: 10.3389/FMICB.2017.01185.

- [119] B. R. Johnson, J. Hymes, R. Sanozky-Dawes, E. D. C. Henriksen, R. Barrangou, and T. R. Klaenhammer, 'Conserved S-Layer-Associated Proteins Revealed by Exoproteomic Survey of S-Layer-Forming *Lactobacilli*', *Appl Environ Microbiol*, vol. 82, no. 1, p. 134, Jan. 2016, doi: 10.1128/AEM.01968-15.
- [120] F. Iannino, C. K. Herrmann, M. S. Roset, and G. Briones, 'Development of a dual vaccine for prevention of *Brucella abortus* infection and *Escherichia coli* O157:H7 intestinal colonization', *Vaccine*, vol. 33, no. 19, pp. 2248–2253, 2015, doi: 10.1016/J.VACCINE.2015.03.033.
- [121] F. Iannino, P. J. Uriza, C. M. Duarte, M. V. Pepe, M. S. Roset, and G. Briones, 'Development of a Salmonella-based oral vaccine to control intestinal colonization of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in animals', *Vaccine*, vol. 40, no. 8, pp. 1065–1073, Feb. 2022, doi: 10.1016/J.VACCINE.2022.01.032.
- [122] M. A. Al-Ghouti and D. A. Da'ana, 'Guidelines for the use and interpretation of adsorption isotherm models: A review', *Journal of Hazardous Materials*, vol. 393. Elsevier B.V., Jul. 05, 2020. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.122383.
- [123] S. T. Loughran and D. Walls, 'Tagging Recombinant Proteins to Enhance Solubility and Aid Purification', *Methods Mol Biol*, vol. 1485, pp. 131–156, 2017, doi: 10.1007/978-1-4939-6412-3_8.
- [124] D. Walls and S. T. Loughran, 'Tagging recombinant proteins to enhance solubility and aid purification', *Methods Mol Biol*, vol. 681, pp. 151–175, 2011, doi: 10.1007/978-1-60761-913-0_9.
- [125] W. W. Ward and S. H. Bokman, 'Reversible denaturation of *Aequorea* green-fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein', *Biochemistry*, vol. 21, no. 19, pp. 4535–4540, 1982, doi: 10.1021/BI00262A003.

- [126] R. E. Mares, S. G. Meléndez-López, and M. A. Ramos, 'Acid-denatured Green Fluorescent Protein (GFP) as model substrate to study the chaperone activity of protein disulfide isomerase', *Int J Mol Sci*, vol. 12, no. 7, pp. 4625–4636, Jul. 2011, doi: 10.3390/IJMS12074625.
- [127] S. Enoki, K. Saeki, K. Maki, K. K.- Biochemistry, and undefined 2004, 'Acid denaturation and refolding of green fluorescent protein', *ACS Publications*, Accessed: Apr. 16, 2023. [Online]. Available: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/bi048733+>
- [128] E. J. Muruaga, G. Briones, and M. S. Roset, 'Biochemical and functional characterization of *Brucella abortus* cyclophilins: So similar, yet so different', *Front Microbiol*, vol. 13, Oct. 2022, doi: 10.3389/FMICB.2022.1046640.
- [129] M. S. Roset, L. G. Fernández, V. G. DelVecchio, and G. Briones, 'Intracellularly Induced Cyclophilins Play an Important Role in Stress Adaptation and Virulence of *Brucella abortus*', *Infect Immun*, vol. 81, no. 2, p. 521, Feb. 2013, doi: 10.1128/IAI.01125-12.
- [130] M. S. Roset, T. G. Alefantis, V. G. Delvecchio, and G. Briones, 'Iron-dependent reconfiguration of the proteome underlies the intracellular lifestyle of *Brucella abortus*', *Scientific Reports 2017 7:1*, vol. 7, no. 1, pp. 1–15, Sep. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-11283-0.
- [131] M. J. Corbel, 'Brucellosis: an overview.', *Emerg Infect Dis*, vol. 3, no. 2, p. 213, 1997, doi: 10.3201/EID0302.970219.
- [132] J. Fanghänel and G. Fischer, 'Insights into the catalytic mechanism of peptidyl prolyl cis/trans isomerases', *Front Biosci*, vol. 9, pp. 3453–3478, 2004, doi: 10.2741/1494.
- [133] L. D. Zydowsky *et al.*, 'Active site mutants of human cyclophilin A separate peptidyl-prolyl isomerase activity from cyclosporin A binding and calcineurin inhibition',

Protein Science, vol. 1, no. 9, pp. 1092–1099, 1992, doi: 10.1002/PRO.5560010903.

- [134] S. Sheng and F. Kong, 'Separation of antigens and antibodies by immunoaffinity chromatography', *Pharm Biol*, vol. 50, no. 8, pp. 1038–1044, Aug. 2012, doi: 10.3109/13880209.2011.653493.
- [135] R. Ollier *et al.*, 'Single-step Protein A and Protein G avidity purification methods to support bispecific antibody discovery and development', *MABs*, vol. 11, no. 8, pp. 1464–1478, Nov. 2019, doi: 10.1080/19420862.2019.1660564.
- [136] J. B. Fishman and E. A. Berg, 'Protein A and Protein G Purification of Antibodies', *Cold Spring Harb Protoc*, vol. 2019, no. 1, p. pdb.prot099143, Jan. 2019, doi: 10.1101/PDB.PROT099143.
- [137] W. Choe, T. A. Durgannavar, and S. J. Chung, 'Fc-Binding Ligands of Immunoglobulin G: An Overview of High Affinity Proteins and Peptides', *Materials (Basel)*, vol. 9, no. 12, 2016, doi: 10.3390/MA9120994.
- [138] Ó. J. Prado *et al.*, 'The effect of packing hydrophilization on bacterial attachment and the relationship with the performance of biotrickling filters', *Biotechnol Bioeng*, vol. 103, no. 6, pp. 1060–1067, Aug. 2009, doi: 10.1002/bit.22354.
- [139] A. Calhoun, 'Polypropylene', in *Multilayer Flexible Packaging: Second Edition*, Elsevier Inc., 2016, pp. 35–45. doi: 10.1016/B978-0-323-37100-1.00003-X.
- [140] V. Busico and R. Cipullo, 'Microstructure of polypropylene', *Prog. Polym. Sci.*, vol. 26, pp. 443–533, 2001.
- [141] J. Karger-Kocsis and T. Bárány, *Polypropylene Handbook*. Springer, 2019.
- [142] A. A. Homaei, R. Sariri, F. Vianello, and R. Stevanato, 'Enzyme immobilization: An update', *Journal of Chemical Biology*, vol. 6, no. 4. Springer Verlag, pp. 185–205, Oct. 01, 2013. doi: 10.1007/s12154-013-0102-9.

- [143] R. di Cosimo, J. Mc Auliffe, A. J. Poulouse, and G. Bohlmann, 'Industrial use of immobilized enzymes', *Chem Soc Rev*, vol. 42, no. 15, pp. 6437–6474, Jul. 2013, doi: 10.1039/c3cs35506c.
- [144] J. Guisan, *Immobilization of Enzymes and Cells*, vol. 22. in *Methods in Biotechnology*TM, vol. 22. Totowa, NJ: Humana Press, 2006. doi: 10.1007/978-1-59745-053-9.
- [145] I. de Ory, G. Cabrera, M. Ramirez, and A. Blandino, 'Immobilization of Cells on Polyurethane Foam', *Methods Mol Biol*, vol. 2100, pp. 407–415, 2020, doi: 10.1007/978-1-0716-0215-7_27.
- [146] C. R. Hankermeyer and R. S. Tjeerdema, 'Polyhydroxybutyrate: plastic made and degraded by microorganisms', *Rev Environ Contam Toxicol*, vol. 159, pp. 1–24, 1999, doi: 10.1007/978-1-4612-1496-0_1.
- [147] Ł. Kaniuk and U. Stachewicz, 'Development and Advantages of Biodegradable PHA Polymers Based on Electrospun PHBV Fibers for Tissue Engineering and Other Biomedical Applications', *ACS Biomater Sci Eng*, vol. 7, no. 12, pp. 5339–5362, Dec. 2021, doi: 10.1021/ACSBBIOMATERIALS.1C00757.
- [148] A. L. Rivera-Briso and Á. Serrano-Aroca, 'Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate): Enhancement strategies for advanced applications', *Polymers*, vol. 10, no. 7. MDPI AG, Jul. 03, 2018. doi: 10.3390/polym10070732.
- [149] I. Younes and M. Rinaudo, 'Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications', *Mar Drugs*, vol. 13, no. 3, pp. 1133–1174, Mar. 2015, doi: 10.3390/MD13031133.
- [150] S. Satitsri and C. Muanprasat, 'Chitin and Chitosan Derivatives as Biomaterial Resources for Biological and Biomedical Applications', *Molecules*, vol. 25, no. 24, Dec. 2020, doi: 10.3390/MOLECULES25245961.
- [151] M. N. V. Ravi Kumar, 'A review of chitin and chitosan applications', *React Funct Polym*, vol. 46, no. 1, pp. 1–27, Nov. 2000, doi: 10.1016/S1381-5148(00)00038-9.

- [152] D. B. Hirsch *et al.*, 'Sulfanilic acid-modified chitosan mini-spheres and their application for lysozyme purification from egg white', *Biotechnol Prog*, vol. 34, no. 2, pp. 387–396, Mar. 2018, doi: 10.1002/BTPR.2588.
- [153] G. Carta and A. Jungbauer, *Protein chromatography : process development and scale-up*, 2nd ed. 2020. Accessed: Jan. 26, 2023. [Online]. Available: <https://www.wiley.com/en-us/Protein+Chromatography%3A+Process+Development+and+Scale+Up%2C+2nd+Edition+-p-9783527824021>
- [154] S. P. Schwaminger, P. Fraga-García, M. Eigenfeld, T. M. Becker, and S. Berensmeier, 'Magnetic separation in bioprocessing beyond the analytical scale: From biotechnology to the food industry', *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 7, no. SEP. Frontiers Media S.A., 2019. doi: 10.3389/fbioe.2019.00233.
- [155] M. Koneracká *et al.*, 'Immobilization of Enzymes on Magnetic Particles', pp. 217–228, 2006, doi: 10.1007/978-1-59745-053-9_19.
- [156] L. Andersson and K. Mosbach, 'Alcohol dehydrogenase from horse liver by affinity chromatography', *Methods Enzymol*, vol. 89, no. C, pp. 435–445, Jan. 1982, doi: 10.1016/S0076-6879(82)89076-9.
- [157] M. Šafaříkova, I. Roy, M. N. Gupta, and I. Šafařík, 'Magnetic alginate microparticles for purification of α -amylases', *J Biotechnol*, vol. 105, no. 3, pp. 255–260, Nov. 2003, doi: 10.1016/J.JBIOTEC.2003.07.002.
- [158] A. M. Prodan, S. L. Iconaru, C. S. Ciobanu, M. C. Chifiriuc, M. Stoicea, and D. Predoi, 'Iron oxide magnetic nanoparticles: Characterization and toxicity evaluation by in vitro and in vivo assays', *J Nanomater*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/587021.
- [159] A. Nadi, D. Boyer, N. Charbonnel, A. Boukhriss, C. Forestier, and S. Gmouh, 'Immobilisation of *bacteria* onto magnetic nanoparticles for the decolorisation and

degradation of azo dyes', *IET Nanobiotechnol*, vol. 13, no. 2, pp. 144–149, 2019, doi: 10.1049/iet-nbt.2018.5026.

- [160] K. Hola, Z. Markova, G. Zoppellaro, J. Tucek, and R. Zboril, 'Tailored functionalization of iron oxide nanoparticles for MRI, drug delivery, magnetic separation and immobilization of biosubstances', *Biotechnol Adv*, vol. 33, no. 6 Pt 2, pp. 1162–1176, Nov. 2015, doi: 10.1016/J.BIOTECHADV.2015.02.003.
- [161] D. Ranmadugala, A. Ebrahiminezhad, M. Manley-Harris, Y. Ghasemi, and A. Berenjian, 'Magnetic immobilization of bacteria using iron oxide nanoparticles', *Biotechnol Lett*, vol. 40, no. 2, pp. 237–248, Feb. 2018, doi: 10.1007/S10529-017-2477-0.
- [162] A. Ebrahiminezhad, V. Varma, S. Yang, and A. Berenjian, 'Magnetic immobilization of *Bacillus subtilis natto* cells for menaquinone-7 fermentation', *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 100, no. 1, pp. 173–180, Jan. 2016, doi: 10.1007/S00253-015-6977-3/METRICS.
- [163] E. Buxbaum, 'Fundamentals of protein structure and function, second edition', *Fundamentals of Protein Structure and Function, Second Edition*, pp. 1–521, Jan. 2015, doi: 10.1007/978-3-319-19920-7/COVER.
- [164] B. A. Baldo, 'Chimeric fusion proteins used for therapy: indications, mechanisms, and safety', *Drug Saf*, vol. 38, no. 5, pp. 455–479, May 2015, doi: 10.1007/S40264-015-0285-9.
- [165] J. Płotka, M. Tobiszewski, A. M. Sulej, M. Kupska, T. Górecki, and J. Namieśnik, 'Green chromatography', *J Chromatogr A*, vol. 1307, pp. 1–20, Sep. 2013, doi: 10.1016/J.CHROMA.2013.07.099.
- [166] J. F. Hester, X. Lu, J. D. Calhoun, R. A. Hochstein, and E. J. Olson, 'Orthogonal pre-use and post-use efficiency testing for single-use anion exchange chromatography', *J Chromatogr A*, vol. 1654, p. 462445, Sep. 2021, doi: 10.1016/J.CHROMA.2021.462445.

[167] J. Sambrook, E. R. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.), 2nd ed. New York, 1989.

Este manuscrito corresponde a la última versión de la Tesis Doctoral titulada “Desarrollo de una novedosa plataforma cromatográfica basada en la proteína S-layer de lactobacillus acidophilus para la purificación de proteínas”, elaborada por Emanuel Muruaga, tesista, bajo la dirección de Gabriel Briones y Mara Roset, directores de tesis.



Dr. Emanuel Muruaga

[Tesista]



Dr. Gabriel Briones

[Director de Tesis]



Dra. Mara Roset

[Director de Tesis]