



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

**Desarrollo de nuevos sistemas poliméricos para regeneración
tisular.**

Autor: Tomás Sánchez Gutiérrez

Tutor/es: Dra. Alessandra Girotti

Dr. Javier Arias Vallejo

Dra. Raquel Muñoz Martínez

1. RESUMEN.....	4
2. INTRODUCCIÓN.	5
2.1 INGENIERÍA GENÉTICA.....	5
2.1.1 Enzimas de restricción.	7
2.1.2 Clonación de DNA.	8
2.2 ELASTINA, RECOMBINÁMEROS DE TIPO ELASTINA Y APLICACIONES.....	14
2.2.1 Estructura secundaria de la Elastina.....	14
2.2.2 Recombinámetros tipo elastina (ELRs).....	16
2.2.3 Aplicaciones de los ELRs.	18
2.3. REGENERACIÓN NEURONAL PERIFÉRICO.....	20
3. OBJETIVOS.....	22
4. MATERIALES Y MÉTODOS	23
4.1 MATERIALES.....	23
4.1.1 Reactivos químicos.	23
4.1.2 Materiales biológicos.	24
4.1.3 Proteínas.....	25
4.1.4 Vectores.....	27
4.1.5 Oligómeros sintéticos usados en la síntesis del polímero final.....	28
4.1.6 Kits de extracción y purificación de DNA.....	30
4.2 MÉTODOS.....	30
4.2.1 Electroforesis de DNA.	30
4.2.2 Determinación de la concentración de DNA.....	33
4.2.3 Purificación de plásmidos.	33
4.2.4 Digestión de DNA con enzimas de restricción.	35
4.2.5 Tratamiento de DNA con enzimas de defosforilación.....	35
4.2.6 Reacciones de ligación.	36
4.2.7 Transformación de cepas bacterianas.....	36
4.2.8 Bioproducción de polímeros recombinantes.	38
4.2.9 Purificación de polímeros recombinantes.	40
4.2.10 Caracterización física de polímeros recombinantes.....	41
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
5.1 DISEÑO DE POLIMEROS Y ESQUEMAS PARA LA CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS.....	44
5.1.1 Diseño del polímero 1.....	44
5.1.2 Diseño del polímero 2.....	45
5.1.3 Diseño del polímero 3.....	47

5.2 SÍNTESIS DE PLÁSMIDOS.....	48
5.2.1 Síntesis del plásmido que codifica al polímero 1.....	48
5.2.2 Síntesis del plásmido que codifica el polímero 2.....	55
5.2.3 Síntesis del plásmido que codifica al polímero 3.....	63
5.3 BIOPRODUCCIÓN.....	67
5.4 CARACTERIZACIÓN DE POLÍMEROS.....	69
5.4.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	69
5.4.2 Resonancia magnética nuclear (RMN).....	70
5.4.3 Espectroscopía de Masas.....	72
6. CONCLUSIÓN.....	73
7. BIBLIOGRAFÍA.....	74
8. ABREVIATURAS.....	79

1. RESUMEN

El creciente interés de la sociedad en los biomateriales se debe principalmente a dos factores: el gran número de población que está directamente afectada a su necesidad y el hecho de que la esperanza de vida haya aumentado de forma considerable. Hasta hoy todavía la medicina recurre a biomateriales nacidos como materiales industriales. El desarrollo de nuevos biomateriales poliméricos empleados en ingeniería tisular y medicina regenerativa requiere alcanzar grados de gran complejidad ya que deben ser capaces de restablecer las propiedades y funcionalidades de los tejidos que se quieren regenerar. En este estudio diseñamos y sintetizamos una cadena polimérica proteínica con secuencia, estructura y propiedades derivadas desde proteínas naturales estructurales como la elastina y la seda; además dos secuencias bioactivas para interactuar con las células del paciente y promover la regeneración neuronal. Su síntesis se lleva a cabo mediante las técnicas de ingeniería genética usando la bacteria *Escherichia coli* tanto en las fases de clonación como como en la expresión de los genes que codifican para nuestros materiales. Construimos un gen quimérico usando determinadas metodologías de ADN recombinante y lo subclonamos en 2 plásmidos, primero uno de clonación y posteriormente con uno de expresión. Se ha comprobado en cada paso de clonación tanto el peso molecular como la secuencia de la cadena de DNA. Una vez obtenido el gen codificante se ha biosintetizado el biopolímero que fue sucesivamente purificado y caracterizado para determinar el grado de pureza y la correspondencia con su diseño mediante RMN (Resonancia Magnética Nuclear), DSC (Calorimetría Diferencial de Barrido) y espectroscopía de Masas. La eficacia del diseño del nuevo material para aplicaciones tisulares neuronales y la biofuncionalidad alcanzada tendrán que ser comprobadas mediante ensayos celulares *in vitro*, que posteriormente serán trasladados en *ex vivo* e *in vivo*.

1. ABSTRACT

The growing interest of society in biomaterials is mainly due to two factors: the large number of population that is directly affected to their need and the fact that life expectancy has increased considerably. Until now, medicine still uses biomaterials born as industrial materials. The development of new polymeric bio-materials, used in tissue engineering and regenerative medicine, needs to reach complex grades, as those materials should be able to restore the features and functions that the tissues to be regenerated have. During this research, we do design and synthesize a protein polymeric chain, which sequence, structure and feature derived from natural structural proteins like elastin and silk in addition two bioactive sequences to interact with the patient's cells and promote a neuronal regeneration effect. This synthesis was developed by genetic engineering techniques, using the *Escherichia coli* bacteria, as a heterologous host, in both, DNA cloning steps, and expression of our materials. We develop a chimeric genes using certain recombinant DNA methodologies and we sub-cloning them in two kind of plasmids; firstly, in specific cloning procedures one, and in a second step in an expression vector. Both the molecular weight and the sequence of the DNA chain have been verified in each cloning step. Once the coding gene was obtained, the biopolymer was produce in bioreactor and successively purified and characterized to determine the degree of purity and the correspondence with its design by means of NMR, DSC and Masses spectroscopy. The effectiveness of the design of the new material for neuronal tissue applications and achieved biofunctionality will have to be proven by *in vitro* cell culture and subsequently demonstrated in *ex vivo* and *in vivo* assays.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1 INGENIERÍA GENÉTICA.

Cuando se comprendió la estructura de los genes y cómo la información que éstos portaban se traducía en proteínas, que conferían funciones o características celulares, comenzó una nueva etapa cuyo fin era buscar la forma de aislarlos, analizarlos, modificarlos y transferirlos de un organismo a otro, para conferirle nuevas propiedades/ventajas, o simplemente inducir una sobreexpresión proteica particular. Justamente, de eso trata la ingeniería genética, un conjunto de metodologías que permite transferir genes de un organismo a otro (clonación), y como consecuencia, obtener las proteínas recombinantes (heterólogas) de interés¹.

En las últimas décadas, la ingeniería genética ha revolucionado la biología permitiendo el gran desarrollo de la biología molecular. El campo de la medicina es, por ejemplo, uno de los más beneficiados con el desarrollo de esta ciencia, haciendo posible un diagnóstico clínico precoz, la identificación genética de individuos, o la terapia génica.

Sin embargo, las aplicaciones derivadas del conocimiento de los genes no sólo se limitan a este campo. Existe la posibilidad de obtener compuestos específicos, gracias a la combinación de los conocimientos y técnicas de la bioquímica, la microbiología, la química y la ingeniería química, aprovechando las propiedades de los microorganismos y los cultivos celulares². De este modo, es posible producir gran número de sustancias y compuestos altamente puros y monodispersos, a partir de recursos renovables y disponibles. Así, se han producido fármacos recombinantes, como la insulina³, tanto en bacterias como en animales transgénicos; o se han mejorado cultivos mediante producción de plantas transgénicas resistentes a enfermedades⁴, etc.

Cabe destacar, como la ingeniería genética ha propiciado un gran avance en el desarrollo de nuevos biomateriales, para ser empleados en aplicaciones biomédicas como la ingeniería de tejidos y medicina regenerativa, destacando los materiales basados en proteínas, pues su producción recombinante proporciona la capacidad de afinar el diseño de su secuencia de aminoácidos, obteniendo las propiedades mecánicas, funcionales y miméticas de interés^{5 y 6}.

Los biomateriales se definen como sustancias naturales o sintéticas que están incluidos en sistemas terapéuticos o diagnósticos⁷; o como componentes de origen biológico que no se relacionan con sus aplicaciones⁸, y que no se les considera nutrientes o fármacos. La medicina y la cirugía recurren de manera creciente a biomateriales nacidos como materiales industriales ajenos al organismo, con la finalidad de encontrar un remedio, definitivo o temporal, al déficit de una función fisiológica. Los biomateriales sintéticos o industriales son aquellos en el que su materia prima es de origen artificial. Estos materiales poseen la capacidad de sustituir total o parcialmente las funciones de un organismo vivo y por lo tanto deben cumplir el requisito de la biocompatibilidad, es decir no interactuar de forma perjudicial con el organismo. El grado de biocompatibilidad de un material depende de su forma, estructura, composición química y de sus propiedades químicas, físicas, mecánicas y eléctricas. Otro requisito muy importante de un biomaterial es su duración, es decir la capacidad de mantener sus prestaciones durante el tiempo necesario, ya sea en un implante provisional o definitivo.

Actualmente se pueden encontrar en la literatura numerosas clasificaciones de los biomateriales. En la Tabla 1 se presenta una clasificación según varios aspectos importantes que se deben tener en cuenta cuando se diseñan nuevos dispositivos. En este trabajo se trabajará con biomateriales poliméricos, estos son polímeros producidos por organismos vivientes desarrollados para aplicaciones médicas.

Clasificación de los Biomateriales		
En base a los efectos producidos en el material	En base a la interacción material/organismo	En base a la naturaleza química
Bioestables	Biotóxicos	Poliméricos
Biodegradables	Bioactivos	Metálicos
	Bioinertes	Cerámicos
		Composite
		De derivación biológica

Tabla 1: Clasificación de los biomateriales en base a sus diferentes propiedades³².

El aumento del interés en los biomateriales se debe a dos factores: la gran cantidad de población que se encuentra afectada directamente a problemas asociados a su utilización, y al aumento considerable de la esperanza de vida. Este último factor tiene implicaciones específicas relacionadas con el mantenimiento de la calidad de vida. Por ello, los implantes biomédicos tendrán mayor importancia y relevancia, y deberán evolucionar para garantizar prestaciones siempre superiores.

Los propósitos que la ciencia de biomateriales tendrá que alcanzar están relacionados con la mejoría de su biocompatibilidad, la identificación de las propiedades furtivas, es decir las características que dotan al material de las capacidades para pasar desapercibido, por el sistema inmune al organismo receptor, e íntegro hasta sus dianas, y la creación de nuevos biomateriales cuyas propiedades puedan ser controladas y cambiadas según las necesidades, los llamados “materiales inteligentes”^{9 y 10}. Estos últimos, son materiales que pueden auto-repararse o adaptarse autónomamente a determinadas condiciones ambientales. Entre ellos se encuentran los geles que responden a estímulos físico-químicos como cambios de temperatura o de pH y que pueden ser muy interesantes en la obtención de matrices para la liberación controlada de medicamentos, los polímeros fotosensibles, los polímeros superconductores usados en la fabricación de "microchips", fibras, filamentos o los súper-absorbentes expansibles que retienen agua y aumentan su tamaño hasta en 500 veces su volumen original¹¹. Por último, la aportación de la emergente nanotecnología será también determinante.

El rápido progreso en los últimos años de estos biomateriales y, de hecho, su propia existencia, es el resultado de utilizar unas pocas técnicas de biología molecular e ingeniería genética que se describen a continuación, permitiendo su producción recombinante de una manera extremadamente versátil y controlada.

2.1.1 Enzimas de restricción.

Para el desarrollo de las técnicas de biología molecular en ingeniería genética fue esencial el descubrimiento de las enzimas de restricción que han permitido a los investigadores manipular segmentos específicos de DNA. Las enzimas de restricción, o endonucleasas de restricción, reconocen secuencias de bases nucleotídicas específicas en el DNA de doble hélice y cortan ambas hebras del dúplex en lugares concretos. Su función

biológica en los organismos procariontes consiste en eliminar DNA foráneo que pudiera ingresar en ellos, como por ejemplo el de bacteriófagos (virus que infectan a bacterias).

Cada enzima de restricción va a reconocer una secuencia específica (sitio de restricción) en el DNA de entre 4 a 8 pares de bases e hidrolizan un enlace fosfodiéster en cada hebra de la región reconocida. Una característica notable de estos sitios de corte es que en muchos casos son palíndromos y están dispuestos simétricamente (Figura 1). Los cortes con estas enzimas pueden ocurrir dejando lo que se conoce como extremos “cohesivos” si el corte ocurre corrido en una hebra respecto la otra, dejando en este caso un fragmento de hebra simple, o pueden obtenerse extremos “romos”, con DNA doble cadena (Figura 1).

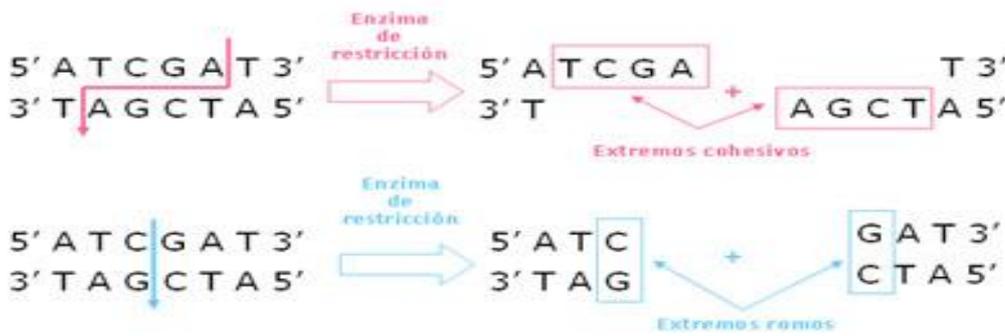


Figura 1: Cortes de enzimas de restricción generando extremos cohesivos y romos ^{Lab Basics:}
 Corte y pega (diseña tu propio clon)

Es importante destacar que a medida que el sitio de restricción de una enzima tenga mayor número de pares de bases, la frecuencia de corte será menor, ya que es menos probable que se encuentre esta secuencia de reconocimiento en una molécula de DNA¹².

2.1.2 Clonación de DNA.

La generación de sitios específicos de corte en el DNA gracias a la actuación de los enzimas de restricción permitió llevar a cabo el *proceso de clonación del DNA*. Este proceso consiste en que un fragmento de DNA obtenido a partir de un organismo (DNA foráneo) es insertado enzimáticamente en un plásmido o vector, obteniéndose un plásmido recombinante. Un plásmido es una molécula de DNA extracromosómico circular capaz de replicarse y transcribirse de forma independiente del DNA cromosómico. A diferencia del cromosómico, los plásmidos no son necesarios para la viabilidad de la célula bacteriana; sin embargo, algunos contienen genes que resultan útiles para la célula hospedadora (como los que

confieren resistencia a antibióticos). El plásmido recombinante obtenido es insertado en células hospedadoras. A medida que la célula hospedadora se divide en dos células hijas, además de replicar su propio DNA, también replica el DNA del vector, el cual incluye el DNA foráneo. El proceso mediante el cual se introduce un vector a una bacteria se denomina transformación (Figura 2).

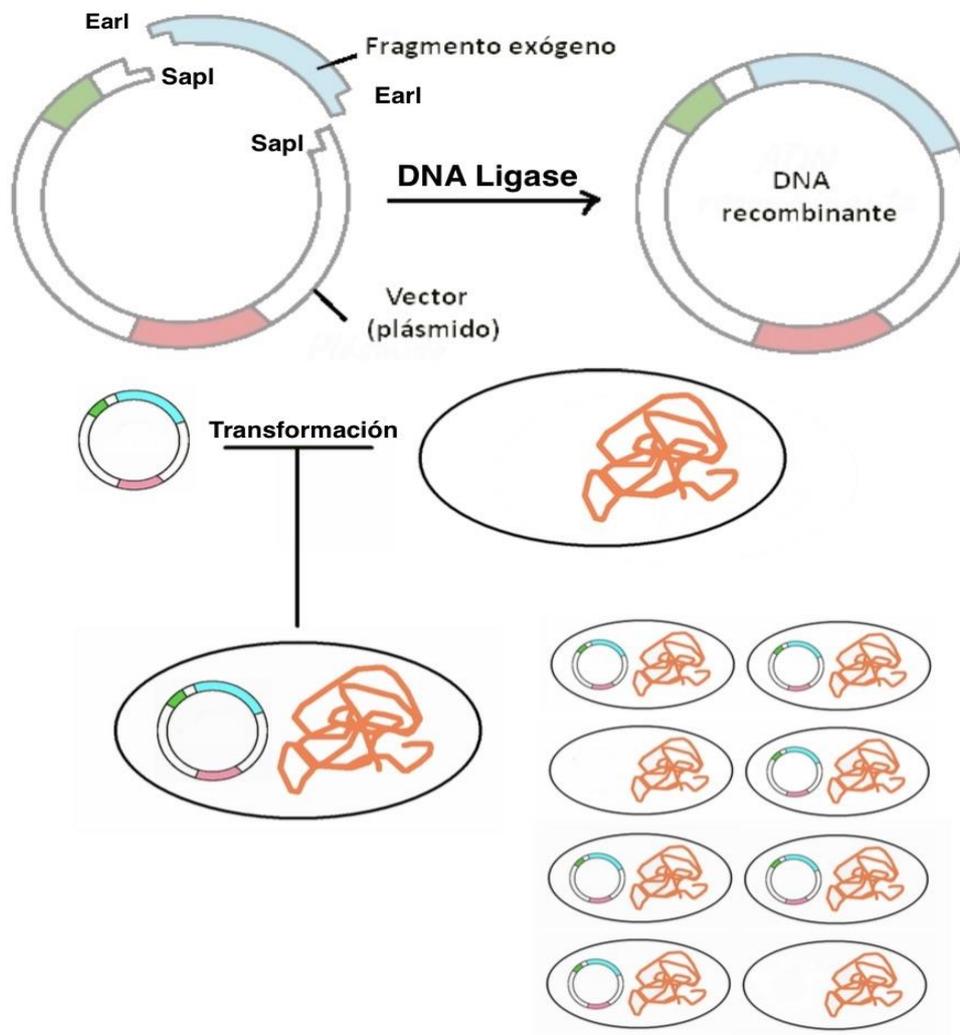


Figura 2: Esquema de la clonación de DNA ³⁹ con modif .

Las células hospedadoras suelen ser *bacterias*, ya que presentan ventajas incomparables: organización celular sencilla, el genoma pequeño, fáciles de cultivar, alta eficiencia de incorporación del gen exógeno y proliferación rápida, entre otras.

Cada plásmido o vector que se emplea para la inserción de DNA foráneo y para la transformación bacteriana tiene, por lo menos, una secuencia de DNA que sirve como origen de replicación, es decir, un punto de partida para la réplica del DNA. Estos vectores poseen

un tamaño variable de entre 1 hasta 250 kilopares de bases (kpb), con un contenido de 2 a 30 genes, lo que facilita su entrada a la bacteria. Dentro de este tipo de moléculas de DNA, podemos diferenciar los plásmidos de clonación y los plásmidos de expresión; los primeros carecen de elementos promotores y reguladores de la producción de la proteína recombinante, elementos que están presentes en los plásmidos de expresión, y que son los encargados de producir grandes cantidades de RNA mensajero asociado a las secuencias del DNA exógeno introducido y, finalmente, la proteína recombinante. Por regla general, los plásmidos de expresión presentan un número bajo de copias por célula hospedadora, mientras que los plásmidos de clonación suelen estar presentes como varias copias dentro de la célula, lo que facilita enormemente su aislamiento y purificación¹³.

Los plásmidos, de forma general, exhiben tres elementos característicos en su conformación más básica:

-El “polylinker” ó MCS (multiple cloning site), región con sitios de restricción únicos que se pueden utilizar para la inserción del gen de interés.

-El gen de resistencia a un determinado antibiótico. (ej: Amp, resistencia a ampicilina)

-El origen de replicación bacteriana (ori): región esencial que contiene los genes involucrados en la replicación y su control.

Se representa un plásmido modelo en la Figura 3.

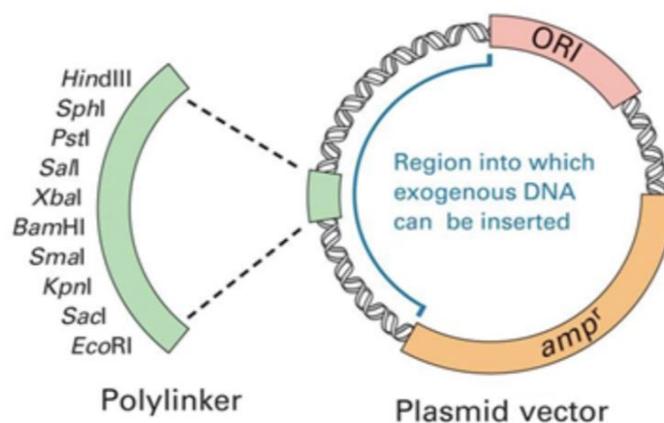


Figura 3: Esquema de plásmido modelo⁴⁰.

El DNA plasmídico puede presentar varias conformaciones, las cuales (para un tamaño dado) tienen diferentes movilidades electroforéticas¹⁴. Las conformaciones más habituales y su movilidad electroforética se muestran en la Figura 4 y son:

- Circular relajada: DNA con ambas hebras o cadenas sin cortar, pero que ha sido enzimáticamente desenrollado.
- DNA lineal: las hebras del DNA tienen dos extremos o terminales libres, ya sea porque las cadenas fueron cortadas enzimáticamente o porque el DNA era lineal dentro del organismo (poco común).
- DNA superenrollado: es un DNA totalmente intacto con las hebras sin cortar, y con forma de remolino, resultando una forma mucho más compacta. Se encuentra por debajo del lineal y es el más abundante, presentando una mayor densidad de banda.

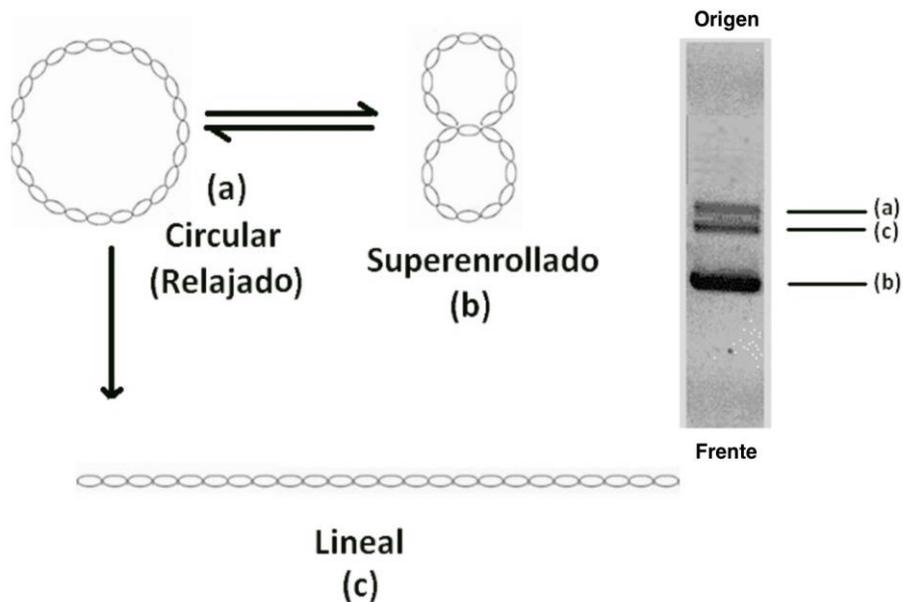


Figura 4: Conformaciones del DNA y movilidad electroforética³⁹.

La factibilidad y velocidad de una clonación depende del tamaño del inserto (fragmento exógeno) y de vector¹. Para obtener un plásmido recombinante, los dos extremos de un fragmento de DNA lineal tienen que “encontrar” los extremos del otro fragmento de DNA lineal para que el enzima *ligasa* los una tal como se observa en la Figura 2. Cuando el tamaño de un fragmento es grande, no es fácil que en el proceso de ligación “encuentre” al fragmento pequeño. La existencia de un fragmento demasiado grande restringe la velocidad de la reacción, como si necesitara más “energía de activación”. En conclusión, es mejor hacer la ligación entre dos fragmentos de tamaño similar o aumentar la relación molar de los fragmentos pequeños (Figura 5).

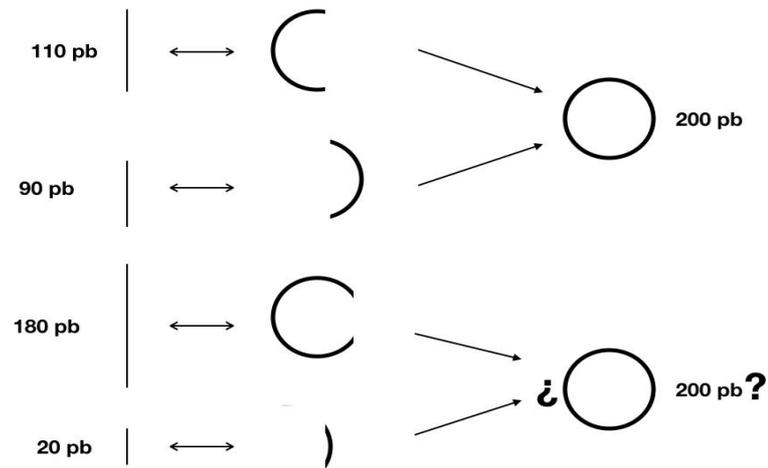


Figura 5: Esquema de ligación de DNA dependiendo del tamaño del inserto.

2.1.2.1 Método iterativo y recursivo.

Para la producción de polímeros proteicos se encuentra el llamado método iterativo y recursivo, es una técnica de preparación paso a paso de oligómeros desde monómeros. Esta técnica permite controlar tanto el orden de adición como el número de fragmentos que se unirán en cada etapa del crecimiento del oligómero. Para realizar este método es necesario crear unas secuencias en las extremidades del segmento de DNA que codifiquen el monómero proteico que es reconocido por dos diferentes endonucleasas (enzimas de restricción) y cuyos cortes produzcan extremos complementarios pero no palindrómicos con el vector de clonaje. Este gen monomérico es clonado en un plásmido que sirve de vector de amplificación génica y que proporciona tanto el siguiente vector de clonaje, cuando se digiere con una única enzima; como el inserto de una nueva clonación, si se corta con ambas enzimas (Figura 6).

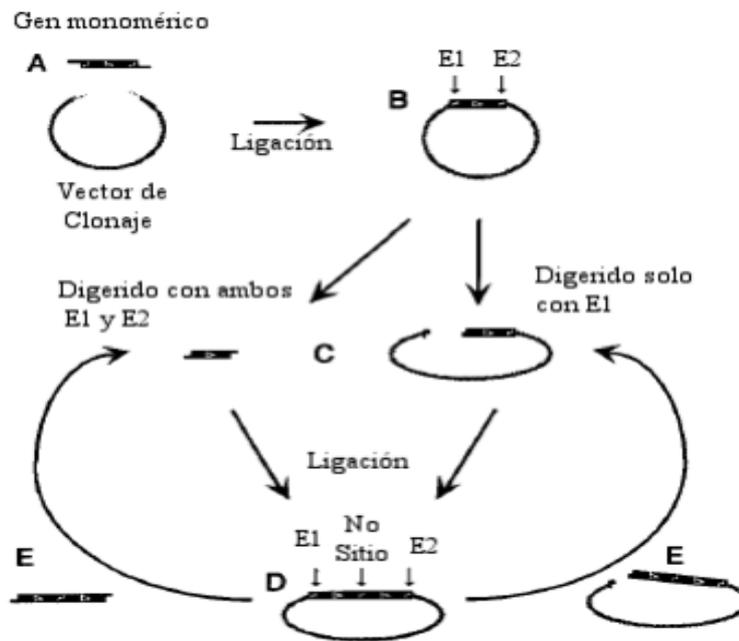


Figura 6: Representación esquemática de la estrategia para crear multímeros por el método iterativo recursivo³². A) Gen monomérico y vector de clonaje antes del proceso de ligación. B) Primera etapa del proceso de crecimiento. C) Digestión con E1 para obtener el vector de clonación y con E1 y E2 para obtener el monómero. D) Segunda etapa de crecimiento. E) Se repite la etapa C para obtener un vector y un monómero de mayor tamaño.

También el método iterativo recursivo ha sido pulido considerablemente, desde el uso de endonucleasas que generaban extremidades que permitían uniones también entre bloques orientados cabeza-cabeza¹⁵ hasta la definida ligación recursiva direccional¹⁶.

2.1.2.2 Método de clonaje “Seamless”.

Un sistema alternativo de ligación unidireccional es el método denominado “seamless cloning”, literalmente clonaje sin costuras, se refiere a la posibilidad de elegir una secuencia específica de DNA que se traduzca en el deseado aminoácido en el punto de corte.

Este método hace independiente el diseño de la secuencia del inserto que codifica el monómero de las secuencias reconocidas por las endonucleasas que lo generan. Esta estrategia es posible por la existencia de un restringido número de enzimas de restricción de tipo II que reconocen una secuencia específica no palindrómica que no coincide con el sitio

de corte, evitando el tener que añadir al oligómero secuencias innecesarias como podía pasar en el anterior método¹⁷.

2.2 ELASTINA, RECOMBINÁMEROS DE TIPO ELASTINA Y APLICACIONES.

La elastina es una proteína estructural con propiedades elásticas del tejido conjuntivo de vertebrados. Se encuentra en la matriz extracelular de arterias, ligamentos, pulmones y piel. Esta proteína se encarga de proporcionar elasticidad a los tejidos y órganos pero también es capaz de regular el comportamiento celular y promover la reparación tisular. Está compuesta por secuencias de aminoácidos, que se repiten a lo largo de su cadena, tales como VPGG, VPGVG, APGVG Y VGVAPG (siendo V=valina, P=prolina, G=glucina, A=alanina). Con este tipo de estructura se puede observar que la elastina tiene una composición aminoacídica peculiar. Aproximadamente el 90% de sus aminoácidos presentan el resto lateral apolar.

Los recombinámeros tipo elastina (ELR “Elastin Like Recombinamers”) son polipéptidos artificiales cuya secuencia está basada en la propia elastina natural pero añadiendo secuencias que modifiquen sus características. Los más usados contienen repeticiones de la secuencia de aminoácidos (VPGXG)_n siendo el residuo “X” cualquier aminoácido excepto prolina, “n” representaría el número de veces que se repite dicha secuencia pentapeptídica a lo largo de la cadena^{18 y 19}.

2.2.1 Estructura secundaria de la Elastina.

El esqueleto de la elastina es extremadamente móvil, con residuos libres de rotar en tres dimensiones, como se evidencia en estudios de resonancia magnética nuclear²⁰. Funcionalmente encontramos en la elastina dos dominios, que se corresponden estructuralmente con un dominio en α -hélice (responsable del entrecruzamiento), rico en alanina y lisina, y un dominio de conformación en forma de espiral (dominio hidrófobo). Las cadenas en espiral β se unen entre ellas mediante numerosos enlaces covalentes intercatenarios mediados por lisinas, formando un retículo²¹. Esta particular estructura permite a las fibras extenderse y volver sucesivamente a la posición de partida, es decir, tener un comportamiento típicamente elástico (Figura 7).

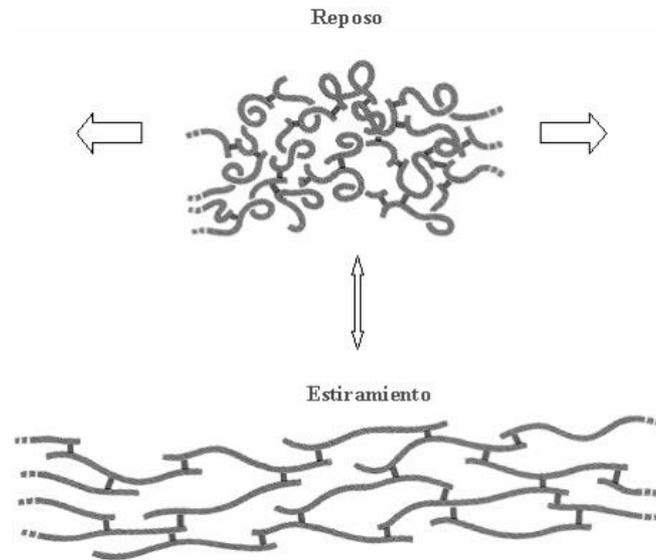


Figura 7: Modelo propuesto para explicar el comportamiento elástico de las moléculas de elastina³².

En estado de reposo, la hebra polipeptídica rica en aminoácidos apolares se encuentra plegada sobre sí misma, gracias a interacciones hidrofóbicas establecidas entre los aminoácidos apolares y que al tensionar la fibra elástica se induce el estiramiento de las zonas apolares en cada una de las hebras polipeptídicas, obligándolas a situarse paralelas entre sí, más expuestas al medio acuoso extracelular, permaneciendo unidas sólo mediante las desmosinas. Las desmosinas son entrecruzamientos producidos al condensar a través de sus cadenas laterales 4 residuos de lisina. Al desaparecer la fuerza deformante cada una de estas zonas de las hebras polipeptídicas recuperan su conformación plegada de forma espontánea y la fibra elástica recupera su longitud inicial²¹.

Estudios originales del grupo de D.W. Urry y col²² sobre el comportamiento estructural de un fragmento de esta proteína natural, la α -elastina; propusieron que cuando la α -elastina se encuentra en disolución acuosa, experimenta una transición al producirse un cambio térmico desde un estado desordenado a un estado ordenado en el que las moléculas son capaces de agregarse, formando una fase densa y pegajosa. Lo que resulta más llamativo de esta transición desorden \rightarrow orden, es que se da cuando la temperatura de la disolución aumenta (en muestras naturales, al pasar de 15°C a 25°C). Este comportamiento está en contra de la tendencia normal de los sistemas físicos, para los cuales cabe esperar un aumento del orden a temperaturas decrecientes, cuando la menor agitación térmica no supera las fuerzas inter e intramoleculares que llevan al material a una disposición regular. Por este motivo a

esta transición se le ha denominado transición inversa, y a la temperatura a la cual ocurre, la denominamos *temperatura de transición* (T_t)²².

Esta característica peculiar de la elastina ha sido, junto con sus propiedades mecánicas y su biocompatibilidad, las responsables de que dicha proteína haya despertado un gran interés en la comunidad científica. Los esfuerzos investigadores más importantes se han centrado en el estudio de la estructura de las fases ordenada y desordenada de la cadena polipeptídica, para aportar luz en la comprensión de las causas que producen esta singular transición de fase, elucidando así la relación estructura-propiedades²³. Dicho interés ha dado como resultado el desarrollo de un amplio abanico de polímeros tipo elastina, utilizados para un número en constante crecimiento de aplicaciones biotecnológicas²⁴.

2.2.2 Recombinámeros tipo elastina (ELRs).

Las características particulares de estos recombinámeros han despertado interés en disolución acuosa y por debajo de su temperatura de transición (T_t), las cadenas de polímero se encuentran desordenadas y completamente hidratadas, hidrofóbicamente, las moléculas de agua se encuentran formando a su alrededor una estructura ordenada tipo clatrato (Figura 8) que protege los extremos apolares del polímero constituidos por aminoácidos, tales como valinas, con una cadena lateral hidrocarbonada, lo que les hace ser especialmente hidrofóbicas, impidiendo de esta forma la formación de enlaces entre los aminoácidos. En cambio, por encima de su T_t , las moléculas de agua que rodean los restos apolares del polímero, pierden la conformación tipo clatrato debido a la agitación térmica. La cadena polipeptídica se pliega hidrofóbicamente, y las cadenas hidrocarbonadas en los extremos apolares mencionadas antes, sí que se ensamblan mediante enlaces amino y puentes de hidrógeno entre los diferentes aminoácidos dando lugar a una estructura regular llamada espiral β (Figura 8) constituida por una sucesión de horquillas β . En este caso la hidratación se reduce pero se mantiene en un 25% de agua.

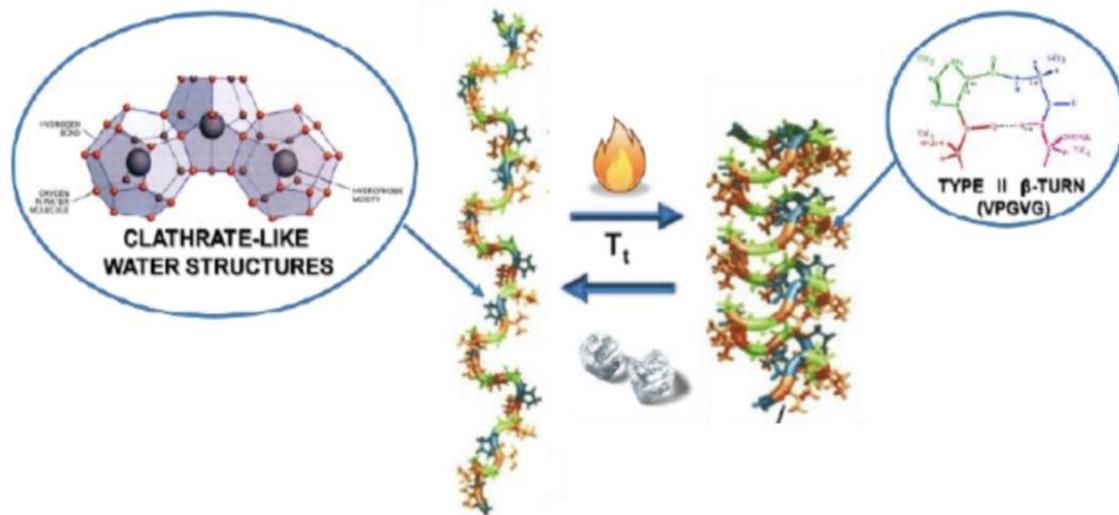


Figura 8: Esquema del cambio conformacional que sufren ELR al estar por encima o debajo de su T_t ⁴⁰.

La mayoría de las proteínas presentan un comportamiento contrario, es decir, el aumento de la temperatura provoca su desplegamiento y su desnaturalización, por lo que a esta transición se le denomina Transición Inversa con la Temperatura (ITT)²⁵.

Es necesario explicar este proceso desde un punto de vista termodinámico haciendo uso de la ecuación de la Energía Libre de Gibbs:

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$$

Siendo:

ΔG =energía libre de reacción

ΔH =variación de entalpía del sistema

T=temperatura

ΔS = variación de entropía del sistema.

Durante el calentamiento, el polímero se pliega y se rompe la estructura tipo clatrato que formaban las moléculas de agua, esto provoca un mayor desorden en el medio y como consecuencia un aumento del valor entrópico ($\Delta S > 0 \uparrow \uparrow$) en el entorno. Por lo tanto, el aumento de la entropía es el causante de que la energía libre de Gibbs sea menor que cero ($\Delta G < 0$) y que el plegamiento del polímero sea un proceso espontáneo²⁶.

Al igual que a cambios de temperatura, los ELRs también responden a cambios de luz o de pH. Son capaces de percibir las condiciones ambientales y sufrir cambios en respuesta a

ellas, convirtiéndolos en unos compuestos muy atractivos en investigación biomédica y biotecnológica por lo que se les califica como “polímeros inteligentes”²⁷.

2.2.3 Aplicaciones de los ELRs.

El grado de conocimiento alcanzado en relación a la estructura y propiedades de estos materiales hace que nuevas aplicaciones estén apareciendo continuamente. El conocimiento de los mecanismos ΔT_i descritos hasta el momento hace que los sistemas diseñados puedan variar entre dos estados gracias a sistemas estímulo-respuesta que produzcan diferentes transformaciones energéticas, estos pueden ser desde estímulos térmicos²⁶, respuestas a una variación de pH e incluso a estímulos luminosos, mientras que el avance en la biosíntesis hace que se puedan obtener, independientemente de la complejidad, casi cualquier polímero deseado. Podemos diseñar, por tanto, estos materiales, de acuerdo a las exigencias de una determinada aplicación.

La extraordinaria biocompatibilidad de estos materiales hace del campo de la biomedicina una de las áreas donde más aceptación están teniendo. El poli (VPGVG) ha sido el péptido más estudiado hasta la fecha, constituyendo una gran parte de cadenas polipeptídicas, y formando parte del polímero usado en este estudio. El poli (VPGVG) ha sido expuesto a la batería completa de pruebas recomendadas por la ASTM (American Society for Testing Materials) para materiales y dispositivos en contacto con tejidos, fluidos tisulares y sangre²⁷. El grado de biocompatibilidad es excepcional y supera el que presentan biomateriales ya clásicos como la silicona o los poliuretanos. A pesar de la naturaleza polipeptídica de estos polímeros, no ha sido posible obtener anticuerpos monoclonales frente a la mayoría de ellos. Esto puede ser debido a que el sistema inmune ignora estos polímeros ya que no los puede distinguir de la elastina natural. Además, los productos secundarios derivados de la biodegradación de estos polímeros son aminoácidos naturales²⁸.

Por tanto, la biocompatibilidad de estos polímeros, unida a las propiedades de autoensamblaje y la posibilidad de producir polímeros a la carta gracias a la ingeniería genética, hacen de estos polímeros un producto muy atractivo para su utilización en biomedicina.

2.2.3.1. Matrices de adhesión celular y reconstrucción tisular.

En ensayos con cultivos celulares se comprobó que las matrices de poli (VPGVG) presentan una adhesión celular prácticamente inexistente²⁹, es posible la obtención de matrices que tengan un comportamiento totalmente opuesto gracias a la incorporación de grupos funcionales intercalados que promuevan una clara adhesión. El primer diseño de estos materiales para ingeniería de tejidos es el que incluye la secuencia de adhesión celular RGD (Asp-Gly-Asn). Experimentos con la matriz polimérica poli (n (VPGVG), (GRGDSP)) han demostrado una gran eficiencia de este material para promover la adhesión celular³⁰. Desde este material inicial, estos polímeros han ido evolucionando con la incorporación de más funcionalidades que tienen como propósito la imitación de la matriz extracelular. Por ejemplo, la Figura 9 muestra la secuencia de un polímero tipo elastina que incluye varias funcionalidades como son la de adhesión celular con la secuencia REDV (Arg-Glu-Asp-Val) que es específica para células endoteliales (representada en verde en la figura), una secuencia para entrecruzamiento químico (en rojo), una base de pentapéptidos tipo elastina (azul) y un hexapéptido diana de proteasas (rosa) y que sirve para dirigir al reabsorción del polímero cuando éste ya no es necesario³¹.



Figura 9: Representación esquemática de la secuencia y estructura del monómero REDV, los cuatro bloques funcionales han sido representados con diferentes formas y colores³².

La idea de los materiales para ingeniería de tejidos ya no es solo la creación de un material biocompatible y con ciertas propiedades mecánicas que reemplace enteramente al tejido dañado del organismo, sino la de un material que interactúe con el organismo, por ejemplo promoviendo la proliferación celular. Además sería deseable que el material se encuentre en el organismo solo durante un cierto tiempo, a modo de andamiaje, para ir siendo reemplazado paulatinamente por tejido natural que crece dentro del andamiaje a la vez que el material sintético se reabsorbe y se elimina^{31 y 33}.

2.3. REGENERACIÓN NEURONAL PERIFÉRICO.

Las lesiones nerviosas son parte de una patología clínica muy frecuente, generalmente secundarias a traumatismos en accidentes de tráfico o deportivos y poseen un rango de lesión muy variable, desde lesiones microscópicas a nivel metabólico en la neurita, hasta alteraciones macroscópicas con disrupción completa de la anatomía nerviosa, lo que provoca secuelas muy variables desde lesiones en el nervio óptico hasta lesiones en la médula, alcanzando en algunos casos tasas de discapacidad muy elevadas³⁴.

La regeneración nerviosa es un proceso coordinado y complejo en el que participa tanto la neurona, las células acompañantes de Schwann (Figura 10) y todas las demás células y matriz extracelular que forman el tejido nervioso lesionado. Existen dos características básicas para obtener un resultado óptimo de regeneración nerviosa que son, una alineación correcta de las fibras nerviosas; y una tensión mínima en el punto de coaptación, es decir una tensión mínima en la zona donde se ha producido la lesión³⁴.

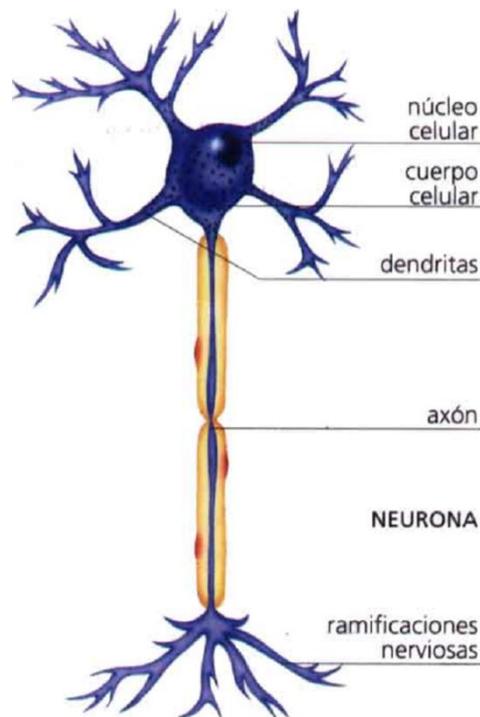


Figura 10: Estructura de la neurona^{WordPress}.

En las últimas décadas, multitud de estudios se han puesto en marcha buscando mejorar la tasa de regeneración nerviosa, aunque resulta necesario continuar con la búsqueda

de nuevas alternativas con un mayor éxito regenerativo ya que hasta ahora los resultados siguen siendo todavía discretos. Una de las posibles estrategias para la regeneración nerviosa en la que se orienta este trabajo es el uso de exoenzimas que permitan el crecimiento de la neurona a través del uso de señales extracelulares con su aplicación en ciertas condiciones, aquí entra la *Clostridium botulinum*.

Clostridium botulinum produce el prototipo de C₃ transferasas que ribosilan ADP (C₃bot), se dirigen a proteínas de la familia Rho de GTPasas: RhoA, B y C inactivandolas. Por lo tanto, las C₃ transferasas representan una herramienta común para estudiar funciones celulares dependientes de Rho.

En la investigación neurocientífica previa, se ha demostrado que la C₃bot transferasa podía promover el crecimiento axonal en un cultivo neuronal primario, en modelos de lesión del nervio óptico y lesión de la médula espinal experimental. Durante el crecimiento de la neurita, se producen conos de crecimiento detectan señales extracelulares que les sirven de guía. Con la experimentación, se han acumulado pruebas de que C₃bot no sólo actúa como una enzima, además es capaz de promover el crecimiento de la neurita en un modo de acción no enzimático, es decir opera como una de estas señales extracelulares sirviendo de guía de crecimiento de la neurita.

En la aplicación de C₃bot deficiente de enzima, cuyo aminoácido catalítico (glutamato) había sido eliminado, se obtuvo el efecto de facilitar el crecimiento de neuronas del hipocampo.

El estudio posterior determinó la longitud mínima del fragmento de aminoácidos (29 aminoácidos) que todavía es capaz de inducir la ramificación en un cultivo primario neuronal y en el crecimiento axonal y dendrítico.

Además, se observaron efectos beneficiosos sobre la regeneración axonal y la recuperación funcional de la lesión de la médula espinal en ratones cuando este péptido deficiente en enzima se aplicó en el sitio de la lesión.

Todo esto demuestra que la C₃bot transferasa tiene un enorme potencial en la aplicación biológica in vivo^{35 y 36}.

3. OBJETIVOS.

Este trabajo se centra en el diseño y la síntesis de nuevos materiales proteicos de tipo elastina (ELR) diseñado para generar un sistema con aplicación terapéutica que permitan su utilización terapéutica en lesiones agudas y crónicas de médula espinal por la combinación de un efecto estructural, anti-inflamatorio y regenerador. Las herramientas de la biología molecular nos permiten combinar bloques génicos para poder producir los polímeros proteicos recombinantes. Para poder producir una matriz sintética en forma de hidrogel, se propone la combinación de diferentes secuencias estructurales (elastina con proteína de seda) y bioactivas (secuencia RGD de la fibronectina, péptido biomimético pm26TGF- β 1 y C₃bot). La síntesis y producción de estos biomateriales proteicos se lleva a cabo de manera biotecnológica en la bacteria *Escherichia coli*.

El péptido C₃bot estará ligado al ELR mediante una secuencia sensible a metaloproteasas (CM₂) para que sólo sea activo tras su liberación, una vez llegue el cono de crecimiento axonal. El C₃bot por su especificidad neuronal sería más interesante para fases subagudas o crónicas dirigidas a promover la regeneración axonal. La posible sustitución del péptido C₃bot por otros péptidos con actividad antiinflamatoria o neuroprotectora permitirían el desarrollo de hidrogeles más orientados a la fase aguda post-lesión.

Se propone el diseño de tres polímeros específicos a sintetizar la construcción de sus genes sintéticos:

- a. ELR 1: pm26TGF- β 1, péptido biomimético de TGF β , en el extremo amino separado por la secuencia de reconocimiento de las metaloproteasas (CM₂) del esqueleto del polímero. Se obtendría la liberación controlada de pm26TGF- β 1, con el objetivo de promover una cicatrización temprana no inhibitoria, se evitaría la eventual inducción de fibrosis excesiva en el sitio de la lesión.
- b. ELR 2: fragmentos C₃bot situados a ambos extremos de la cadena proteica, para poder incrementar la cantidad de péptido bioactivo que se libera.
- c. ELR 3: fragmento C₃bot en el extremo amino. Esta versión no será sensible a metaloproteasas, es posible que su actividad biológica disminuya en esta versión fundida pero se considera que se mantendrá disponible durante las diferentes etapas de la regeneración.

Para finalizar se realizarán pruebas de caracterización químico-físicas de un polímero ya producido: Pentasilk-CM₂-C₃bot (PCC).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES.

4.1.1 Reactivos químicos.

Todos los reactivos empleados en la realización de este trabajo son:

- Agarosa Seakem. (Cambrex)
- Agarosa MetaPhor. (Cambrex)
- Ampicilina. (Apollo Scientific)
- Butanol: uso bioquímico. (Merck)
- Dimetilsulfóxido (DMSO).
- Etanol: uso bioquímico. (Merck)
- Glucosa. (Sigma Aldrich)
- Ácido clorhídrico. (Merck)
- Isopropanol: uso bioquímico. (Merck)
- Kanamicina. (Apollo Scientific)
- Metanol: uso bioquímico. (Merck)
- DNA Marker: 1 kb plus DNA Ladder. (Invitrogen)
- EDTA. (Sigma Aldrich)
- Simply Safe. (EURX)
- Sulfato amónico. (Merck)
- Tris (hidroximetil) aminometano (TRIS). (Sigma Aldrich)
- PMSF. (Sigma Aldrich)

• Soluciones químicas preparadas.

- DNA Loading Buffer 5x: 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 60 mM EDTA, 0.03% bromphenol blue, 60% glycerol.
- TAE 1x: Tris-acetato 40mM, EDTA 1mM pH 8.
- PBS (pH 7,4): Tampón fosfato 5mM, NaCl 140mM.
- Tampón de sonicación (10mM Tris-base pH 8, 1mM EDTA, 1mM PMSF).

El material de laboratorio se usa estéril o se esteriliza en autoclave a 121° durante 2 horas y a 1 atmósfera de presión. Las disoluciones se preparan usando agua desionizada tipo ultrapura.

4.1.2 Materiales biológicos.

4.1.2.1 Cepas bacterianas.

Se usa la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) como clonadora y productora del plásmido recombinante. Las cepas usadas en este trabajo son:

- XL1-Blue COMPETENT GRADE (Stratagene, Eficiencia (cfu/μg de pUC18 DNA) $\geq 10^8$).
- XL1-Blue SUBCLONING GRADE (Stratagene, Eficiencia (cfu/μg de pUC18 DNA) $\geq 10^6$).

4.1.2.2 Medios de Cultivo.

Los medios usados en el crecimiento y transformaciones de las cepas bacterianas son:

-Luria-Bertani (LB): 25 g/L (10 g de NaCl, 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura, Pronadisa). Se esteriliza en autoclave (120°C, 20 minutos). Suplementado con los antibióticos correspondientes o glucosa a la concentración de uso.

-LB-agar (placas de cultivo): medio LB (25 g/L) con bacto-agar 1,5% (p/V) (Fluka). Se esteriliza en autoclave (120°C, 2 horas). Suplementado con los antibióticos correspondientes y glucosa a la concentración de uso en los casos necesarios.

-SOC Broth (Super Optimal Catobolite repression) (Sigma Aldrich): usado para transformaciones bacterianas.

-Terrific Broth (TB): 47 g/L (glicerol 4 mL/L). Se esteriliza en autoclave (120°C, 20 minutos). Suplementado con los antibióticos correspondientes. Medio usado para la expresión y producción del polímero una vez aislado el DNA.

4.1.3 Proteínas.

Códigos de representación de las bases nitrogenadas: A= adenina, C= citosina, G= guanina y T= timina.

4.1.3.1 Enzimas de Restricción:

Las enzimas de restricción empleadas en el trabajo son:

- *FastDigest DpnI, EamI 104I (EarI), FastDigest EcoRI, Lgull (SapI), FastDigest XbaI.* (Thermo Fisher).

Todas las enzimas se han utilizado según el protocolo del fabricante y con el tampón adecuado.

Entre estos tipos de enzimas se deben diferenciar en dos tipos:

- Enzimas usadas para diagnóstico del gen por electroforesis.

- *FastDigest DpnI*: enzima de restricción que reconoce los sitios de corte.

Sitio de reconocimiento	Resultado del corte
5'GATC 3'CTAG	5'---GA TC---3' 3'---CT AG---5'

Usada para diagnosticar la transformación con el vector de expresión pET7.

- *FastDigest EcoRI*: enzima de restricción que reconoce:

Sitio de reconocimiento	Resultado del corte
5'GAATTC 3'CTTAAG	5'---G AATTC---3' 3'---CTTAA G---5'

Usada para diagnosticar la transformación con el vector de expresión pDA.

- *FastDigest XbaI*: enzima de restricción que reconoce la secuencia:

Sitio de reconocimiento	Resultado del corte
5'TCTAGA 3'AGATCT	5'---T CTAGA---3' 3'---AGATC T---5'

Se usa para diagnosticar junto a *EcoRI* si el vector pET7 se ha introducido adecuadamente en el plásmido.

- Enzimas usadas para la clonación del gen de interés:

- *EamI 104I (EarII)*: enzima de restricción que reconoce:

Sitio de reconocimiento
5'CTCTTCN'NNN 3'GAGAAGNNN'N

- *Lgull (SapI)*: enzima de restricción que reconoce:

Sitio de reconocimiento
5'GCTCTTCN'NNN 3'CGAGAAGNNN'N

4.1.3.2 Otras Enzimas:

Se han usado las siguientes enzimas:

- *T4 DNA Ligase* (Thermo Fisher): para las ligaciones.
- *FastAP Phosphatase* (Thermo Fisher): defosforilar.
- *Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)* (Ilustra): defosforilar.

Todas las enzimas son empleadas según el protocolo del fabricante, excepto la *T4 DNA Ligase* que se utilizó según se ha explicado durante el punto 5.2 de este trabajo.

4.1.4 Vectores.

Los vectores utilizados en este trabajo se clasifican en dos tipos:

- **Vectores de clonación:** utilizados para la clonación de los distintos fragmentos de DNA.

- *pDrive All*: modificado a partir del vector pDrive de Qiagen, por el Dr. A. Ribeiro del grupo de Investigación Bioforge.

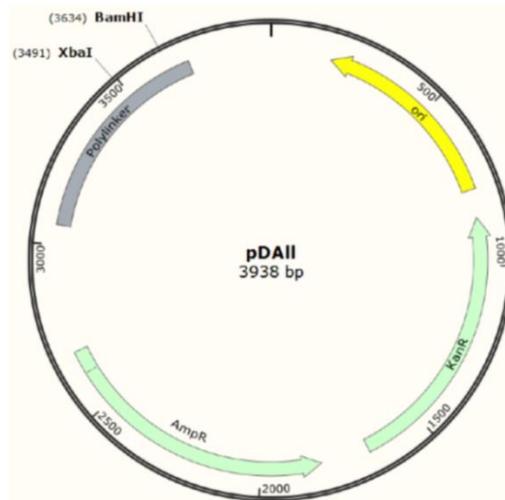


Figura 11: Representación de los dominios de pDrive ALL³².

- **Vectores de expresión:** usados para la expresión de los diferentes polímeros recombinantes.

- *pET7 RARE*: construido a partir del vector pET-25b (+) de Novagen, por la Dra. Alessandra Girotti y Tatiana Flora del grupo Bioforge.

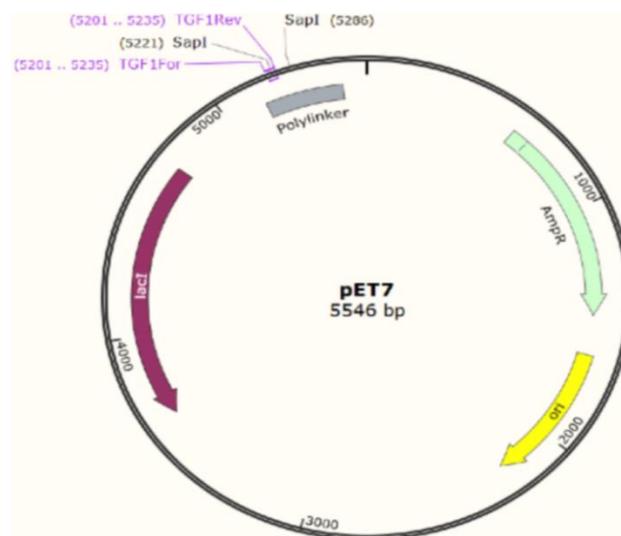


Figura 12: Representación de los dominios de pET7 RARE⁴⁰.

- *pET7 TGF β*: construido a partir del vector pET7 RARE por Marcos Herrero del grupo Bioforge. La secuencia TGF β se corresponde con un péptido de 7 aminoácidos procedente del TGF β (Factor de crecimiento transformante β), pm26TGF β1 es una citoquina pleiotrópica con múltiples funciones en el desarrollo, la curación de heridas y la regulación inmunológica. El péptido procedente del TGF β codificado por el plásmido pm26TGF β1 ha demostrado poseer propiedades antiinflamatorias potentes y no presenta quimioatracción de neutrófilos (controlando la reactividad de las células T)³⁷.

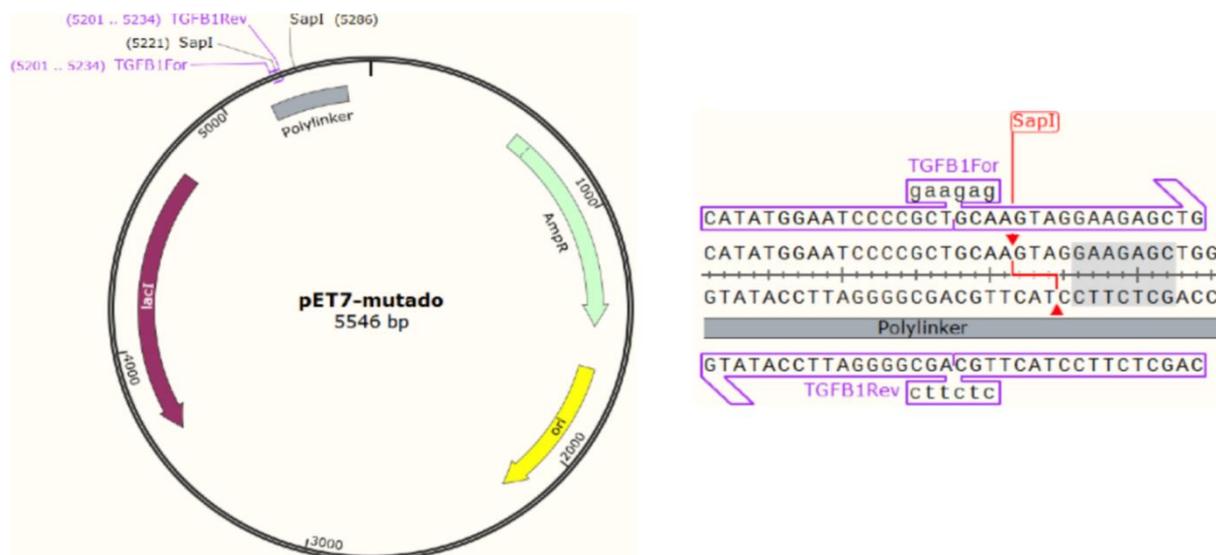


Figura 13: Representación de los dominios de pET7 TGF β⁴⁰.

4.1.5 Oligómeros sintéticos usados en la síntesis del polímero final.

Códigos de representación de los aminoácidos: V: valina, P: prolina, G: glicina, E: Acido glutámico, I: isoleucina, A: alanina, T: treonina, R: arginina, S: serina, M: metionina, W: triptófano, Q: glutamina, L: leucina, K: lisina, Y: tirosina, H: histidina, D: Acido aspártico, F: fenilalanina.

Todos los genes habían sido anteriormente sintetizados en el laboratorio de BIOFORGE, y se habían clonado independientemente en la zona de inserción (polylinker) del vector de clonación pDrive ALL. Esto quiere decir que de inicio ya tenemos 3 tipos de plásmidos pDrive ALL, se denominan pDA Pentasilk, pDA CM₂ y pDA C₃bot. Estos genes codifican para los siguientes polímeros:

- **Polímero (EIS)₂RGD₆ (Pentasilk)**: el polímero está codificado por un gen que contiene 4173 pares de bases y presenta un peso molecular de 120266,5 MW, codifica esta secuencia proteica:

{{(VPGVG)₂VPGE(VPGVG)₂]₁₀(VGIPG)₆₀[V(GAGAGS)₅G]₂[(VPGIG)₅AVTGRGDSPASS]₆

Cuenta con 4 subdominios y 8 bloques:

Subdominios: (E: [(VPGVG)₂VPGE(VPGVG)₂]₁₀; I: (VGIPG)₆₀; S (SLP):

[V(GAGAGS)₅G]₂;

RGD: [(VPGIG)₅AVTGRGDSPASS]

Bloques: 2 bloques EIS y 6 bloques RGD.

Es un polímero que consta de dos repeticiones del bloque EIS que forma el esqueleto del material proteico y del RGD que es la parte bioactiva de la molécula. Este es un bloque anfifílico que a Temperatura y pH fisiológico se autoensambla y forma hidrogeles. El primer bloque relacionado con las propiedades de autogelación y con la sensibilidad a la temperatura del ELR, corresponde a 3 subdominios: i) el subdominio E, es un fragmento de la elastina altamente hidrofílico, cuya secuencia ha sido diseñada para que su T_t sea mucho más alta que la temperatura fisiológica, ii) subdominio I, que es un ELR cuya T_t es inferior a 20° C, el subdominio S (SLP), un péptido proveniente de la seda de los gusanos de seda, que otorga mayor estabilidad ya que a temperaturas mayores que la T_t adquiere la estructura de lámina β de manera irreversible. Tal combinación de subdominios ELR con diferentes T_t no es casual, ya que fueron diseñados y combinados de tal manera que, a la temperatura fisiológica (37° C), el subdominio E permanece completamente soluble en agua, mientras que el I ya no es soluble. Este estado anfifílico conduce a la formación de diferentes estructuras autoensambladas. El bloque RGD es la secuencia bioactiva derivada de la fibronectina. Es la más conocida y eficaz entre las que promueven la adhesión celular por integrinas. Por este motivo es utilizada en materiales con alto potencial en aplicaciones biomédicas³⁸.

- **Fragmento CM₂**: oligómero codificado por un gen que contiene 159 pares de bases y con un peso molecular de 4212,50 MW, codifica la secuencia proteica:

VGGGGGPMGSPGWGGGGVGGGGQPQGLAKGGGGVGGGGPQGIWQGGGG

Contiene secuencias peptídicas selectivamente reconocidas por endoproteasas (enzimas que digieren secuencias contenidas en el interior de un péptido), lo que permite que se produzca una digestión enzimática y se libere el fragmento al que se encuentra unido el polímero principal.

- **Fragmento C₃bot:** oligómero codificado por un gen que contiene 90 pares de bases y un peso molecular de 3058,55 MW, codifica la secuencia proteica:

VAKGSKAGYIDPISAFAGQLEMLLRHSTV

Fragmento que promueve la regeneración neuronal (punto 2.3.2).

4.1.6 Kits de extracción y purificación de DNA.

Se usaron dos kits diferentes para la purificación de DNA plasmídico a partir de un cultivo de *E. coli*: *NucleoSpin Plasmid* (Macherey-Nagel), para cantidades pequeñas de plásmido, y *Quantum Prep Plasmid Midiprep Kit* (Bio-Rad), para cantidades más grandes, mientras que la extracción de DNA a partir de un gel de agarosa se realizó con *PureLink Quick Gel Extraction Kit INVITROGEN* (Life Technologies).

4.2 MÉTODOS.

4.2.1 Electroforesis de DNA.

- **Electroforesis de DNA en gel de agarosa Seakem.**

La electroforesis en gel de agarosa (polisacárido formado por galactosas α y β que se extrae de las algas) es una técnica que sirve para separar, analizar y purificar moléculas de DNA por sus tamaños. En este trabajo se ha utilizado para separar un plásmido integro, o bien fragmentos que resultan tras su digestión con un enzima de restricción. Esta técnica también permite realizar el diagnóstico del estado las moléculas de DNA tras un proceso de ligación o purificación.

El gel de agarosa Seakem permite la separación de fragmentos de DNA comprendidos entre 100 y 15000 pb dependiendo de la concentración de agarosa utilizada tal como se muestra en la Tabla 2. Se preparan geles a distintos porcentajes de agarosa en tampón de TAE 1x, dependiendo del tamaño de los fragmentos de DNA de la muestra o del tipo de gel que

queremos realizar, si analítico o preparativo. Los geles analíticos son empleados en el diagnóstico del estado de una molécula de DNA, son poco voluminosos (25 mL de TAE 1x) y de concentraciones variables, en cambio los geles preparativos se usan para la purificación de moléculas de DNA tras un proceso de digestión enzimática, son geles de mayor volumen que los analíticos (50-60 mL, dependiendo del volumen de la digestión), y se deben realizar con todo el material extremadamente limpio para que no haya contaminación cruzada o de *DNA*sas.

Tamaño de fragmentos en pares de bases (pb)	% Final de agarosa
1000-15000	0,5
800-10000	0,8
400-8000	1
300-7000	1,2
200-4000	1,5
100-3000	2

Tabla 2: Porcentaje (%) de Agarosa Seakem óptimo para separar fragmentos de DNA con diferentes longitudes (pb de DNA).

La preparación del gel se realiza añadiendo a un matraz Erlenmeyer la cantidad de agarosa y el volumen de tampón necesario según la concentración y el tamaño del gel deseado (dependiendo si es analítico o preparativo). La agarosa se pesa, se hidrata unos minutos en el tampón TAE 1x y el Erlenmeyer se pesa antes de fundir la agarosa en el microondas. Una vez fundida la agarosa se vuelve a pesar el Erlenmeyer para recuperar el agua evaporada en el proceso, añadiendo gota a gota y con agitación, agua MilliQ o ultrapura, de esta forma no se modifica la concentración y el gel es homogéneo y uniforme. Se vierte en el formador de geles y se coloca también el peine que creará los pocillos, donde se colocarán las muestras de DNA.

A las muestras de DNA se les añade 0,20 volúmenes de tampón de carga (DNA Loading Buffer) 5x a exclusión de las digestiones con endonucleasas de restricción cuyo buffer ya ha sido preparado para este procedimiento. Tras haber aplicado las muestras en los

pocillos del gel, los geles se someten a un voltaje fijo comprendido entre 2 y 7 V/cm que distan los electrodos. La electroforesis se desarrolla atendiendo a lo que hayan recorrido los colorantes de referencia.

Para finalizar, el gel se tiñe entre 10 y 20 minutos en una solución de Simply Safe™ en TAE 1x, y las bandas de DNA se visualizan en un transiluminador de luz UV Gel Doc™ EZ Imager. Como patrón de tamaño se emplea el marcador DNA 1kb Plus Ladder.

- Electroforesis de DNA en gel de agarosa Metaphor.

Este tipo de agarosa de alta resolución es utilizada para separar y resolver fragmentos de DNA de tamaño menor, entre 20 y 1000 pares de bases, tal como se indica en la Tabla 2. Se ha usado MetaPhor® Agarose para separar y recuperar fragmentos que difieren en tamaños tan solo del 2%. Puede ser usada tanto para la preparación de geles analíticos como preparativos.

Tamaño de fragmentos en pares de bases (pb)	% Final de agarosa
150-800	2
100-600	3
50-250	4
20-130	5

Tabla 3: Porcentaje (%) de Agarosa Metaphor óptimo para separar fragmentos de DNA con diferentes longitudes (pb de DNA).

Los geles se preparan de la misma manera que las agarosas convencionales, pero teniendo precaución de extender los tiempos de hidratación y de controlar la ebullición en el momento de fundir la agarosa para que no forme mucha espuma. Las condiciones de la electroforesis así como a la tinción y a la visualización son sustancialmente los mismos que para las agarosas convencionales.

- Evaluación de los fragmentos de DNA.

La evaluación del tamaño aproximado de los fragmentos de DNA se realiza comparándolos con el patrón comercial de DNA, 1kb Plus DNA Ladder, cuyas bandas corresponden a longitudes de DNA (pb) definidas.

4.2.2 Determinación de la concentración de DNA.

El DNA es cuantificado y evaluada su pureza mediante un Nanodrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific). La pureza se evalúa a través del rango de absorbancias A260/280, siendo cuanto más cercano a 2 más puro el plásmido. Si el DNA no es empleado de forma inmediata, se almacena a 4°C o 20°C.

4.2.3 Purificación de plásmidos.

En este trabajo se han realizado 2 tipos purificaciones de un plásmido:

- **Purificación de un vector producido en bacterias:** esta purificación se ha realizado a través de la utilización de dos kits mencionados previamente (4.1.6) y siguiendo el protocolo establecido por las casas comerciales. El Kit NucleoSpin Plasmid, para purificar cantidades pequeñas de DNA, y el Kit Quantum Prep Plasmid Midiprep, para cantidades más grandes.

Los dos Kits requieren los mismos pasos, representados den la Figura 14 y se explican a continuación:

El primer paso es añadir al cultivo bacteriano el reactivo A1 que contiene RNAsa, enzima que cataliza la hidrólisis del RNA ya que no es de interés y puede interferir en la purificación del DNA, este reactivo se almacena a 4°C para que la RNAsa no se degrade. El siguiente reactivo que se añade es el A2 que contiene SDS (dodecilsulfato sódico) en condiciones alcalinas para separar el DNA genómico del DNA plasmídico, que es el de interés, se continua con el reactivo A3 que contiene ácido acético y se utiliza para neutralizar la reacción. Después de este paso se introduce la solución con ambos tipos de DNA en una microcolumna de extracción donde el DNA queda adsorbido y seguidamente se realizan una serie de lavados con el buffer de lavado para eliminar todo aquello que no se ha ligado a la columna, antes de proceder a la elución del DNA plasmídico purificado.

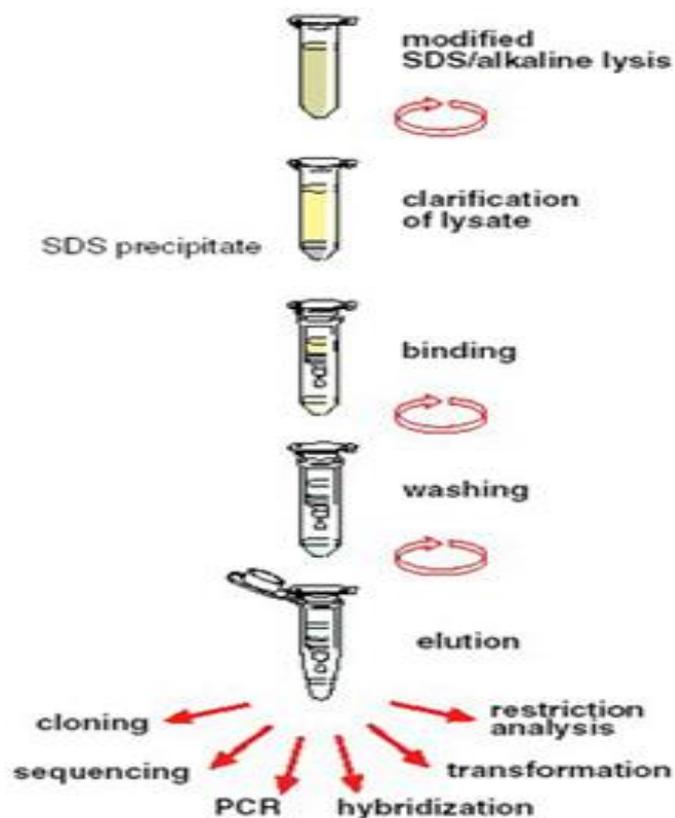


Figura 14: Esquema del proceso de purificación de DNA plasmídico ^{Bioké-webshop}.

- **Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa:** Se realiza con una electroforesis preparativa. El DNA de interés, se separa de otras moléculas de DNA de una mezcla, a través de una electroforesis en un gel de agarosa de concentración apropiada y se visualiza con Simply Safe™ (punto 4.2.1). Posteriormente a la electroforesis, se realiza una incisión con un bisturí alrededor de la banda de DNA de interés, procurando extraer la mínima cantidad posible de agarosa y se procede a su purificación.

La purificación del fragmento de DNA se ha llevado a cabo mediante el sistema antes mencionado (punto 4.1.6) *PureLink Quick Gel Extraction Kit INVITROGEN* (Life Technologies). En primer lugar se añade el reactivo L3 que permite disolver el gel, por cada volumen de gel cortado se le añade 3 del reactivo y se incuba a 50°C con agitación para facilitar la disolución de la agarosa, luego se añade 1 volumen de isopropanol y se transfiere a una columna de extracción, se realizan varios lavados con buffer de lavado que contiene etanol, el uso de estos dos alcoholes se debe a que precipitan el DNA, se utiliza isopropanol debido a que se tiene un gran volumen de muestra, después se realiza con etanol ya que tras todo el proceso de purificación el volumen ha disminuido. La concentración de DNA eluído es cuantificada y evaluada su pureza (punto 4.2.2).

4.2.4 Digestión de DNA con enzimas de restricción.

Las reacciones de restricción se realizan bajo las condiciones indicadas por las casas comerciales que suministran las enzimas (temperatura, concentración, buffer, tiempo de reacción, condiciones en las dobles digestiones, etc.). Se realizan dos tipos de digestiones con enzimas de restricción: la digestión de diagnóstico y la preparativa. La digestión de diagnóstico se usa para comprobar el éxito de una clonación o sus etapas previas, en cambio la preparativa se utiliza para “digerir” una cadena de DNA por el sitio de interés para luego realizar una clonación.

De forma general, las digestiones de diagnóstico que hemos realizado para las que se emplean los enzimas *FastDigest EcoRI*, *DpnI* y *XbaI*, se llevan a cabo en un volumen total de reacción de 5 μ L, se añade 300 ng de DNA (1 μ L de media) con 0,5 μ L del buffer 10x de la enzima correspondiente (*Green Buffer Fast Digest*), 1 unidad de la enzima y 3,35 μ L de agua ultrapura para llegar a un volumen total de 5 μ L, la digestión se incuba durante 20-30 minutos a 37°C. Para digestiones preparativas (con *EarI* y *SapI*) se emplea 1 μ g de DNA con la cantidad de enzima y buffer (Tango Buffer) indicada por la casa comercial (1 volumen de Buffer por cada 10 de reacción) en 20 μ L totales, esta digestión se realiza a 37°C durante 16-21 horas. El alcance de la digestión se comprueba mediante electroforesis de DNA en un gel analítico (punto 4.2.1).

4.2.5 Tratamiento de DNA con enzimas de defosforilación.

La reacción de defosforilación se requiere para eliminar, mediante una hidrólisis, los grupos fosfato de las extremidades cohesivas de DNA linearizado con *SapI* para su posterior utilización en una reacción de ligación de DNA. Se realiza bajo las condiciones indicadas por las casas comerciales que suministran las enzimas (temperatura, concentración, buffer, tiempo de reacción, inactivación, etc.). La defosforilación completa de los plásmidos se ha obtenido utilizando consecutivamente 2 enzimas fosfatasas distintas (*FastAP* y *SAP*), la primera se incuba a 37°C durante 15 minutos y se inactiva 5 minutos a 75°C, para la segunda se aumentan los tiempos de incubación hasta 60 minutos a 37°C e inactivando 15 minutos a 80°C.

El control de la defosforilación de las extremidades cohesivas se realizó mediante la transformación del plásmido según el protocolo habitual (punto 4.2.7), después de una reacción de ligación sin inserto.

4.2.6 Reacciones de ligación.

Las reacciones de ligación realizadas, en los procesos de clonación, a lo largo de este trabajo se han llevado a cabo en un volumen total variable, que va desde las 10 μL a los 20 μL . La cantidad de vector usada es de 20-100 ng, se añade el inserto en una proporción molar desde 1:1 hasta 5:1 con el vector y el enzima *T4 DNA ligasa* (5 U/ μL). La reacción se realiza a 22°C desde los 15 minutos, o hasta 16-21 horas a 4°C. Posteriormente se lleva a cabo la transformación bacteriana.

4.2.7 Transformación de cepas bacterianas.

Se emplean alícuotas de bacterias competentes almacenadas a -80°C. Se descongelan en hielo, en el momento de su uso, siendo esta etapa crítica para la viabilidad. La transformación en estas cepas bacterianas se realiza siguiendo el protocolo especificado por el suministrador.

En este estudio se ha trabajado con una cepa de *E. coli* de dos tipos diferentes de competencia y cada una tiene su tratamiento:

- Transformación con XL1-BLUE Competent Grade:

Usadas para clonaciones ya que tienen una eficiencia transformación de 10^8 transformantes (unidad de colonias formantes por microgramo de DNA de plásmido añadido).

Una vez descongeladas en hielo, se añade 50 μL de las células y 5 μL de la estrategia de ligación en un tubo de polipropileno de 15 mL especial para transformaciones (Falcon 2550). Esta mezcla se deja durante 30 minutos en hielo. Posteriormente, se realiza un choque térmico de 42 segundos a 42°C, para permeabilizar la membrana celular de la bacteria, y que se introduzca el DNA plasmídico en la célula. Después del choque se atempera unos minutos en hielo y se añaden 450 μL de un medio enriquecido (SOC Broth), y se introduce a la incubadora durante 60 minutos a 37°C con agitación a 250 rpm (revoluciones por minuto) para que el cultivo pueda recuperarse sin tener tiempo suficiente para dividirse.

Finalmente se siembran 50-200 μL de la transformación en placas de LB-agar/antibióticos con una concentración adecuada del antibiótico, Ampicilina si se ha realizado con el vector pET 7, o bien Ampicilina y Kanamicina en el caso de haber utilizado

el vector pDrive ALL en una proporción 1:1000 volúmenes, 20 μ L de antibiótico por cada 20 mL de medio. Las bacterias adquieren resistencia a dichos antibióticos por la inserción del plásmido. Las placas se incuban a 37°C hasta la aparición de colonias aisladas (16-21 horas). En el caso de no ser usadas en el momento se almacenan a 4°C. Se almacenan boca abajo para evitar la pérdida de las colonias bacterianas en el caso de que se produzcan condensaciones en las placas.

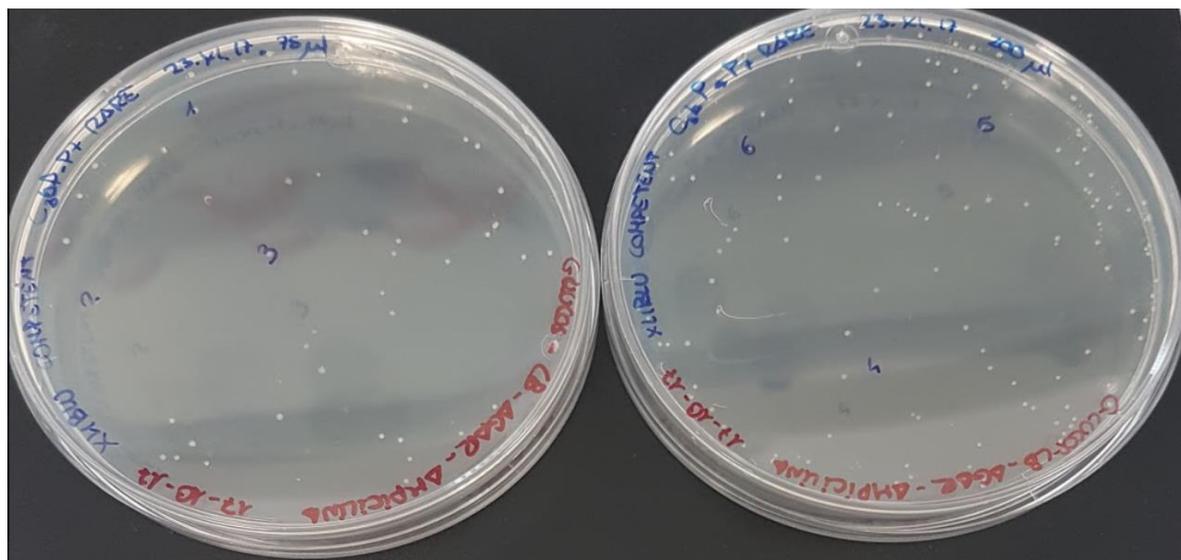


Figura 15: Placas de LB-Agar-Ampicilina con colonias aisladas de *E. coli*.

-Transformación con XL1-BLUE Subcloning Grade:

Este tipo de cepa se usa para realizar subclonaciones, es decir cuando se quiere amplificar o expresar en otra cepa un plásmido entero ya secuenciado. Presenta una eficiencia de 10^6 transformantes por microgramo de DNA.

Para su transformación se sigue el mismo procedimiento que para la cepa descrita anteriormente, variando únicamente la relación entre los volúmenes de plásmido (estrategia de ligación secuenciada) y células y los tiempos de incubación. Se usan 10 μ L de células y 0,5 μ L de plásmido en el mismo tipo de tubo de propileno. La mezcla se incuba 20 minutos en hielo y a continuación se realiza el shock térmico a 42°C durante 30 segundos, y se vuelve a atemperar en hielo. Se añaden 180 μ L del medio de cultivo SOC Broth y se deja incubar 30 minutos a 37°C y con una agitación de 250 rpm. Se siembran 20 μ L de la transformación en placas de LB-agar como se describe en el apartado anterior.

Una vez crecidas las colonias en las placas se deben escoger las colonias que se encuentren lo más aisladas posibles sin que presenten satélites (pequeñas colonias bacterianas que se encuentran alrededor de la bacteria transformante y que pueden poseer una información genética diferente a la de interés) alrededor (Figura 15). Estas colonias se inoculan en medio líquido para su crecimiento, la operación se realiza en campana de flujo laminar, inoculando una colonia en un tubo Falcon de 50 mL que contiene 5-10 mL medio LB o TB (dependiendo del tipo de estudio que se quiere realizar) con los antibióticos correspondientes. Los tubos se incuban a 37°C con agitación de 250 rpm durante 16-21 horas. Una vez que se verifica el crecimiento bacteriano se realiza la purificación del DNA (punto 4.2.3).

En el caso de ser una producción a mayor escala, en vez de usarse de recipiente un Falcon de 50 mL se usa un matraz Erlenmeyer (autoclavado) de 250 mL y se usa 50 mL de medio de cultivo.

4.2.8 Bioproducción de polímeros recombinantes.

El primer paso en la producción de un polímero recombinante tipo elastina (ELR) consiste en la transformación bacteriana del plásmido de interés con un vector de expresión con una cepa BLR de *E. coli*, las bacterias BLR son las más utilizadas en expresión de proteínas de tipo elastina. Las bacterias BLR transformadas se siembran en una placa de LB-agar con los antibióticos necesarios y glucosa (1%). Se incuban durante 12-16 horas a 37°C para permitir el crecimiento de colonias. Seguidamente se inoculan de forma separada, en un Falcon 50mL, 8 colonias aisladas aleatorias y en medio líquido TB y se incuban durante 12-16 horas a 37°C y con agitación orbital a 250 rpm (Figura16). Se analiza el contenido proteico total de cada uno de los cultivos de las 8 colonias, en un gel de acrilamida, con el fin de seleccionar la colonia que presenta mayor producción de proteína recombinante.

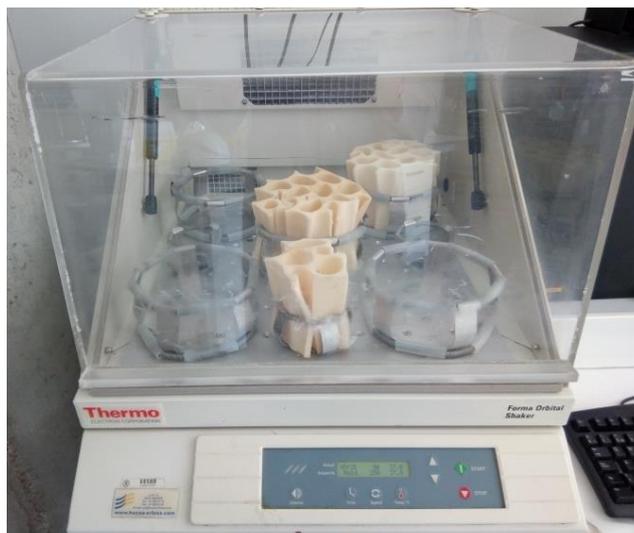


Figura 16: Incubadora con agitación orbital.

Una vez escogida la colonia, se prepara un inóculo, para lo cual se siembra pinchando la colonia en 5 mL de medio (LB con glucosa y con los antibióticos adecuados) y se incuba durante 12-16 horas a 37°C con agitación (250 rpm). Seguidamente se recogen 100 μ L del inóculo, se siembran en 30 mL de medio incubando durante 5 horas en las mismas condiciones. Así se obtiene el segundo inóculo. Posteriormente se introducen 15 mL de este inóculo a dos Erlenmeyer de 2 litros que contienen 500 mL de medio cada uno, se incuban a 37°C y 250 rpm durante 2-3 horas. Este tercer inóculo se añade a un fermentador de 15 litros. De esos 15 litros, 14 Litros son de medio TB y el litro restante el inóculo.

Se conecta el fermentador siguiendo un protocolo definido. El fermentador realiza una producción bacteriana semejante a la realizada en un Erlenmeyer, pero se lleva a cabo con un control más exhaustivo, no solo controlamos la temperatura y la potencia de la agitación, también el pH (pH óptimo 7,1), el flujo de aire que entra al fermentador (20 L/minuto) y por ende la concentración de oxígeno. El fermentador se deja trabajando durante 16 horas.

Pasadas las 16 horas se comprueba si el cultivo ha alcanzado una fase estática de crecimiento (se ha superado la fase exponencial de crecimiento). Esa comprobación se realiza midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm a través un espectrofotómetro. Se recoge una muestra del fermentado y se realiza una dilución 1-20 en medio TB, se mide primero un blanco (medio TB) para ajustar el espectrofotómetro a cero, y luego la muestra, y el valor de la absorbancia se multiplica por 20, que es la dilución de la muestra. Esta medida

de la absorbancia se vuelve a realizar 30 minutos después, y si se mantiene constante o disminuye se puede dar por finalizada la fermentación.

4.2.9 Purificación de polímeros recombinantes.

Una vez llevada a cabo la producción de polímeros recombinantes comienza el proceso de purificación del polímero. Cada polímero ELR tiene un proceso de purificado parecido aunque sí adaptado a sus propiedades, la propiedad que se usa siempre es la transición inversa con la temperatura de cada polímero. Aquí se describe el proceso de purificado tipo de un **(EIS)₂RGD₆ (Pentasilk)**, que consiste en los pasos descritos a continuación.

Primeramente, se lava 3 veces la biomasa fermentada con tampón de lavado (20 mM Tris-base pH 8, 140 mM NaCl) y se recolecta mediante centrifugación en una centrífuga Sorvall RC12BP a 4200 rpm de 25 minutos. Las bacterias se lisan suspendiéndolas en el tampón de sonicación (10mM Tris-base pH 8, 1mM EDTA, 1mM PMSF) y haciéndolas atravesar por un disruptor (TS 0.75KW Constant Systems Limited) tres veces a 1200 bares de presión. El objetivo de esta lisis por presión es romper la pared celular de las bacterias, de forma que liberen todo su contenido.

Posteriormente, se centrifuga la mezcla a 4°C a 14000 rpm durante 30 minutos. El sedimento contiene la fracción insoluble total y el sobrenadante constituye la fracción soluble total con las proteínas de interés. El sobrenadante se acidifica en frío con HCl hasta alcanzar el pH 3,5, se deja en agitación 2 horas a 4°C. Esta etapa conlleva la desnaturalización de la mayoría de las proteínas bacterianas, mientras que los ELR siguen solubles. Después de las 2 horas se centrifuga a 4°C a 13000 rpm durante 30 minutos. Se decanta el sobrenadante, y se le añade un 12,5% de Sulfato Amónico. Se incuba en hielo 30 minutos y se vuelve a centrifugar a 4°C a 13000 rpm durante 30 minutos. Se descarta el sobrenadante y el precipitado, que contiene el polímero de interés, se resuspende con 200 mL de agua ultrapura y se deja con agitación a 4°C 12-16 horas, se vuelve a centrifugar a 4°C a 13000 rpm durante 30 minutos.

Finalmente, el precipitado frío se descarta y al sobrenadante se le vuelve a hacer el proceso de añadir Sulfato Amónico, y el precipitado se resuspende en 50 mL de agua ultrapura y se realiza una diálisis para ajustar el pH a neutro, se filtra a vacío y se deja

liofilizando una semana para que elimine todas las moléculas de agua obteniéndose el polímero puro.

4.2.10 Caracterización física de polímeros recombinantes.

Para la caracterización física de uno de los polímeros diseñados en este trabajo se han empleado las siguientes técnicas:

4.2.10.1 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

La **calorimetría de barrido diferencial (DSC)** es una técnica termoanalítica en la que la diferencia de calor entre una muestra y una referencia es medida como una función de la temperatura. En nuestro caso buscamos saber a qué Temperatura se produce el cambio de fase de nuestro polímero, es decir cuál es la Temperatura de transición (T_t).

El equipo usado es un calorímetro Mettler Toledo 822e equipado con un sistema de refrigeración con nitrógeno líquido. La celda, tal como se muestra en la Figura 17, tiene espacio para dos crisoles, uno para la muestra que se analiza y otro para el crisol de referencia (disolvente en el que se ha disuelto el polímero).



Figura 17: Celda del calorímetro Mettler Toledo 822e donde se coloca la muestra y la referencia.

Primero se prepara una disolución con el polímero purificado, a una concentración de 50 mg/mL en PBS 1x (punto 4.1.1). Se deja disolver toda la noche en la cámara fría a 4°C. El polímero rompe el tampón de PBS teniendo un pH 5,38. El experimento consiste en un barrido de temperatura, donde la muestra y la referencia son calentadas desde 0°C hasta 55°C

con una velocidad de 5°C/min. Antes del comienzo del experimento la muestra se mantiene a 0°C durante 10 minutos. Como referencia se usa PBS 1x sin polímero.

4.2.10.2 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

La espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) estudia el comportamiento de ciertos núcleos atómicos (aquellos que poseen spin nuclear distinto de cero) en presencia de un campo magnético externo. El campo magnético aplicado produce un desdoblamiento de los niveles degenerados de energía del spin nuclear, de modo que pueden inducirse transiciones entre ellos, como consecuencia de la absorción de una radiación electromagnética adecuada. La disposición de los niveles de energía es una propiedad tanto de los núcleos de los átomos de una molécula como de su entorno electrónico y de las interacciones entre ambos.

El RMN se realiza en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) del Parque Tecnológico de la Universidad de Valladolid. El equipo usado **RMN 500 de Agilent Technologies** y ha sido manipulado por un técnico del propio LTI.

Para la realización de la prueba se pesa 1 mg del polímero a caracterizar y se disuelve en DMSO, y se inyectan 0,8 ml de esta disolución a un tubo de RMN.

Su resultado es un espectro que corresponde al número y tipos de átomos diferentes que hay en nuestra molécula, y por tanto los distintos grupos funcionales que contiene. En nuestro caso se realiza de ^1H .

4.2.10.3 Secuenciación de DNA.

La secuenciación automática de DNA se lleva a cabo en Cenit Support Systems S.L., Parque Científico de Salamanca (Villamayor) usando los primers específicos de cada plásmido. Un primer es una cadena de ácido nucleico o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del DNA. Es una secuencia corta de ácido nucleico que contiene un grupo 3'hidroxilo libre que forma pares de bases complementarios a una hebra molde y actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos con el fin de copiar la hebra molde.

4.2.10.4 Espectroscopía de Masas.

La Espectrometría de Masas es una técnica analítica que permite estudiar compuestos de naturaleza diversa y obtener información cualitativa o cuantitativa. Mediante el análisis por Espectrometría de masas es posible obtener información de la masa molecular del compuesto analizado así como obtener información estructural del mismo, o simplemente detectar su presencia y/o cuantificar su concentración. Es necesario ionizar las moléculas, utilizando si fuera preciso una separación cromatográfica (UPLC, GC) previa, y obtener los iones formados en fase gaseosa. Este proceso tiene lugar en la fuente de ionización. Los iones generados son acelerados hacia un analizador y separados en función de su relación masa/carga (m/z) mediante la aplicación de campos eléctricos, magnéticos o simplemente determinando el tiempo de llegada a un detector. Los iones que llegan al detector producen una señal eléctrica que es procesada, ampliada y enviada a un ordenador. El registro obtenido se denomina Espectro de masas y representa las abundancias iónicas obtenidas en función de la relación masa/carga de los iones detectados.

Este experimento se lleva a cabo en el LTI de la Universidad de Valladolid. El equipo utilizado es **Espectrómetro de masas 5973 inert de Agilent Technologies con un sistema de introducción directa SIS Direct Insertion Probe**, el equipo ha sido manejado por un técnico del LTI. Para realizar el estudio se pesan 5 mg del polímero y se determina el peso molecular exacto del polímero.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 DISEÑO DE POLIMEROS Y ESQUEMAS PARA LA CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS.

La obtención de los genes para la producción de estos materiales poliméricos, se ha realizado mediante la utilización del método de clonación iterativo recursivo a partir de genes que producirán los monómeros. Dichos genes que codifican unidades monoméricas se han unido posteriormente mediante la técnica de clonaje “seamless” (2.1.2.2). Con esa técnica, gracias al uso de enzimas de restricción de tipo II, se “emancipa” la secuencia que codificará una proteína, de la secuencia nucleotídica necesaria para su clonación y se proporciona un medio para realizar la unión direccional y consecutiva de segmentos de DNA.

5.1.1 Diseño del polímero 1.

Se diseña el polímero: TGF-CM₂-Pentasilk (TGFCM₂P). Se quiere obtener un polímero que tenga las propiedades mecánicas y físicas características de los ELRs, los cuales forman geles físicos termo-sensibles (con la misma capacidad de gelación en respuesta a la temperatura), y que además presente una carga bioactiva antiinflamatoria, péptido pm26TGF-β1 (TGF β) y que se encuentre separada del Pentasilk por la secuencia de reconocimiento de metaloproteinasas (CM₂). De este modo, se obtendría en un tejido dañado la liberación controlada de pm26TGF β1 por secuencias sensibles a metaloproteinasas como opción para obtener el beneficio de la terapia combinada, liberando de forma limitada en las fases aguda y subaguda de la lesión y con el objetivo de promover una cicatrización temprana no inhibitoria, así se evitaría la eventual inducción de fibrosis excesiva en el sitio de la lesión.



La estrategia de clonación para la obtención del polímero se muestra en la Figura 18 y se puede resumir en los siguientes pasos: primero se produce la digestión del plásmido que contiene el gen pDA Pentasilk con *SapI* obteniendo el vector lineal realizando las subsecuentes defosforilaciones enzimáticas de los extremos del vector, y se realiza la digestión del plásmido pDA CM₂ con *EcoRI* (inserto), finalmente se purifica y se lleva a cabo,

para concluir, con la ligación. Se transforma y extrae el pDA CM₂-Pentasilk (CM₂P) recombinante. Una vez aislado el gen con el plásmido pDA, se debe introducir en la secuencia que contiene la cagar bioactiva antiinflamatoria (TGF β).

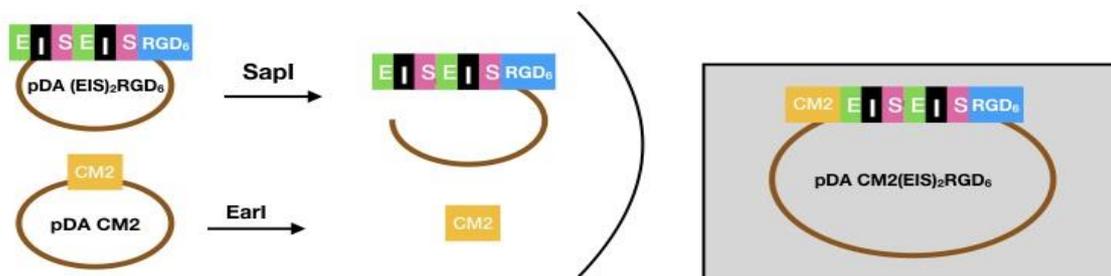


Figura 18: Esquema para la construcción del pDA CM₂P.

5.1.2 Diseño del polímero 2.

Se diseña el polímero: C₃bot-CM₂-Pentasilk-CM₂-C₃bot (CCPCC), para que se autoensamble a un hidrogel, en condiciones fisiológicas y en breve tiempo, con el objetivo de generar un dispositivo *in situ* que promueva específicamente una regeneración de tipo nervioso. Se decide producirlo con doble carga activa para poder incrementar la cantidad del péptido bioactivo que se libera durante el proceso de regeneración del sistema nervioso periférico.



Para obtener el polímero 2 se plantean 2 estrategias de clonación posibles:

Estrategia 1 mostrada en la Figura 19. **Paso 1:** Digerir el plásmido pDA C₃bot con *Sapl*, formando el vector, y digerir el plásmido pDA CM₂ con *EarI*, generando el inserto, **paso 2:** se realiza la ligación de estos 2 fragmentos. **Paso 3:** Se produce la transformación bacteriana y se extrae este plásmido pDA CM₂-C₃bot, que se digiere con *Sapl*. **Paso 4:** digerir pDA CM₂ con *Sapl* (formación de vector), **paso 5:** hacer la ligación con inserto C₃bot. **Paso 6:** Transformación bacteriana y se extrae el plásmido pDA C₃bot-CM₂, se digiere con *EarI*. **Paso 7:** El plásmido pDA Pentasilk se digiere con *Sapl* y se realiza la ligación con el inserto

C₃bot-CM₂. **Paso 8:** Se transformar y extrae el plásmido PDA C₃bot-CM₂-Pentasilk. **Paso 9:** Este plásmido se digiere con *Earl*, generando el inserto. **Paso 10:** Finalmente se realiza la ligación del vector pDA CM₂-C₃bot con el inserto C₃bot-CM₂-Pentasilk. Se transforma y extrae el pDA C₃bot-CM₂-Pentasilk-CM₂-C₃bot (CCPCC).

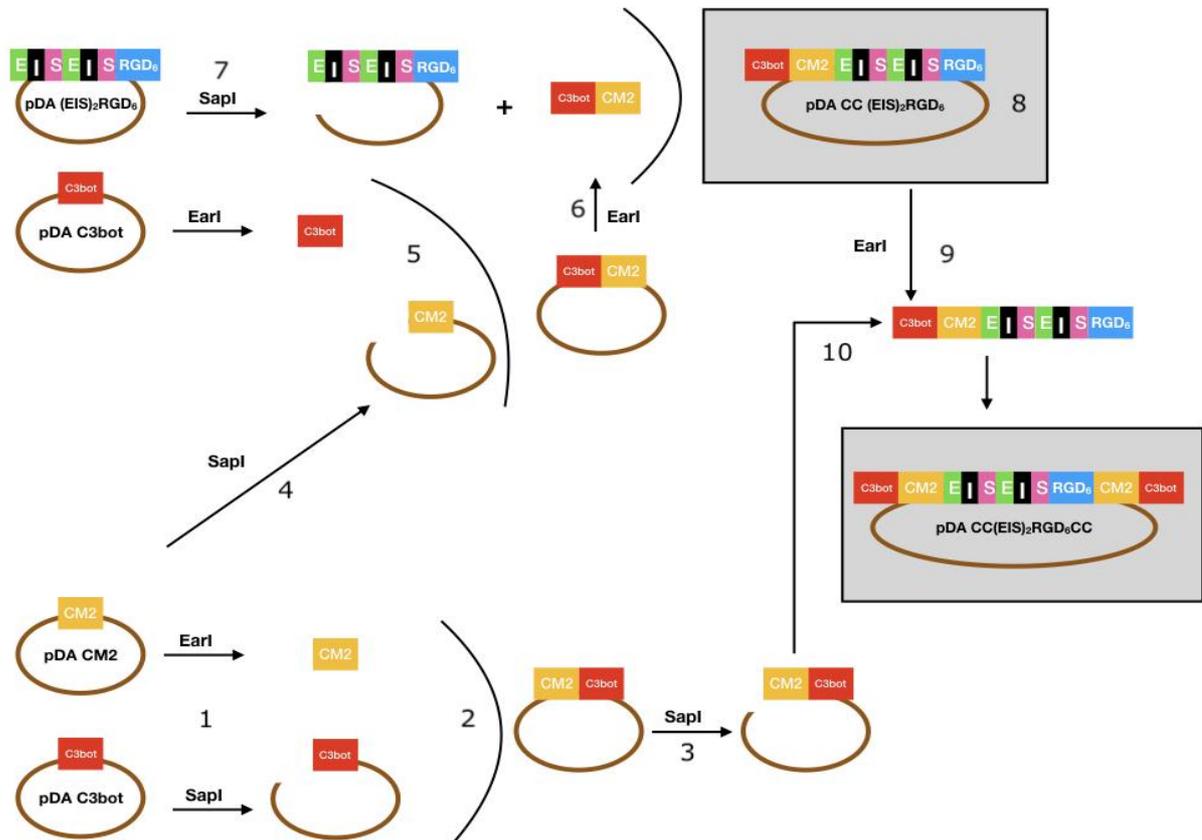


Figura 19: Estrategia 1 para la construcción del pDA CCPCC.

Estrategia 2 mostrada por la Figura 20. **Paso 1:** Digerir el plásmido pDA C₃bot con *SapI*, para formar el vector, y digerir el fragmento CM₂ con *Earl* (Inserto) y realizar la ligación. **Paso 2:** Transformación bacteriana y extracción del plásmido pDA CM₂-C₃bot. **Paso 3:** Este plásmido se digiere con *SapI* (vector), **paso 4:** el pDA Pentasilk se digiere con *Earl* (inserto) y se produce la ligación. **Paso 5:** Transformación bacteriana y extracción del plásmido pDA Pentasilk-CM₂-C₃bot, **paso 6:** que se digiere con *SapI*. **Paso 7:** Se prepara el inserto C₃bot-CM₂. Se digiere el pDA CM₂ con *SapI* (vector) y el pDA C₃bot con *Earl* (inserto), **paso 8:** se produce la ligación. **Paso 9:** Se transforma y produce el plásmido pDA C₃bot-CM₂ y se digiere con *Earl*. **Paso 10:** Finalmente se liga el vector pDA Pentasilk-CM₂-C₃bot con el inserto C₃bot-CM₂. Se transforma y extrae el pDA CCPCC.

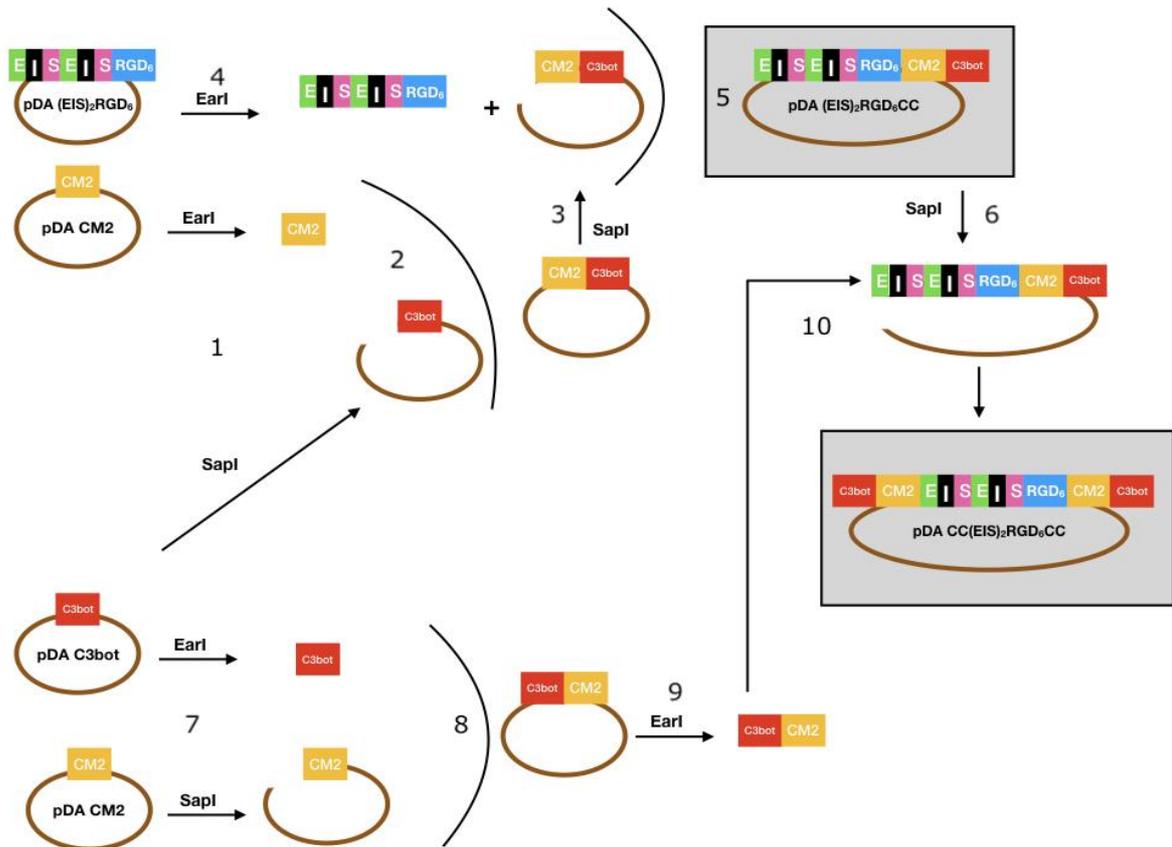


Figura 20: Estrategia 2 para la construcción de pDA CCPCC:

5.1.3 Diseño del polímero 3.

Se diseña el polímero: C₃bot-Pentasilk (C₃botP). En esta versión el polímero no presenta la secuencia sensible a metaloproteinas (CM₂), pero si presenta la secuencia que promueve la regeneración neuronal (C₃bot). Al no presentar la secuencia de reconocimiento de proteasas su actividad biológica posiblemente se vea reducida por no ser un péptido libre, pero se considera que mantendrá su actividad durante más tiempo, en las distintas etapas de la regeneración, mientras esté presente el dispositivo ELR generado por autoensamblado en condiciones fisiológicas.



Para obtener el polímero se plantea la siguiente estrategia de clonación: Se comienza digiriendo el pDA Pentasilk con *SapI* (vector) y el pDA C₃bot con *EarI* (inserto) y se realiza la ligación. Se lleva a cabo la transformación bacteriana y se extrae el plásmido pDA C₃bot-Pentasilk (C3botP).

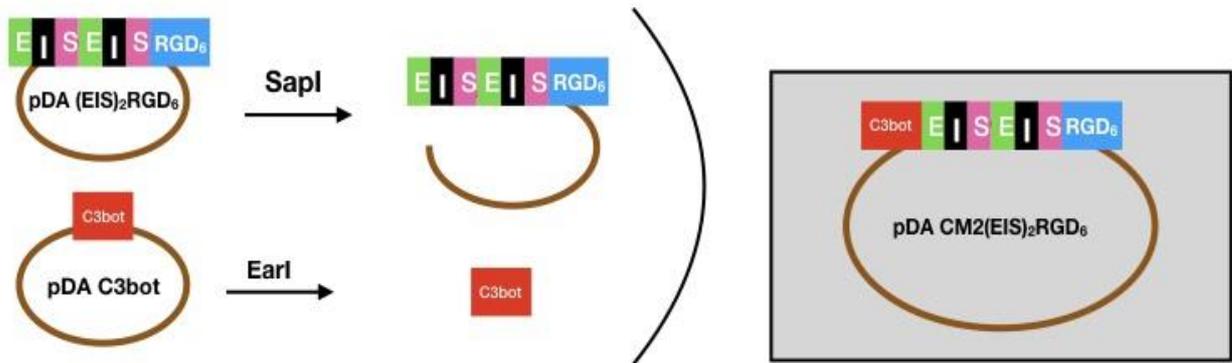


Figura 21: Esquema para la construcción del pDA C₃botP.

5.2 SÍNTESIS DE PLÁSMIDOS.

Como se ha descrito en la introducción (punto 2.2) los ELRs se obtienen por ingeniería genética, es decir tras el diseño de la molécula proteica se construye el gen sintético que la codifica mediante diferentes técnicas, se bioproduce, purifica y caracteriza para obtener productos con las propiedades físicas y mecánicas que nos interesan.

5.2.1 Síntesis del plásmido que codifica al polímero 1.

La síntesis del plásmido pDA CM₂-Pentasilk, que presenta 8270 pares de bases correspondiendo al polímero 1 con un peso molecular de 124455 MW, se realiza por la estrategia propuesta en el punto 5.1.1. No se tuvieron que realizar digestiones preparativas (punto 4.2.4) ya que se poseían los vectores y los insertos necesarios. La clonación se realiza según las condiciones propuestas en la Tabla 4. El tiempo de incubación de la clonación es 15 minutos a 22°C.

Reacción 1: pDA CM₂-Pentasilk	
Plásmido (pDA Pentasilk) 10,8ng/ μL	3 μ L = 32.4 ng
Inserto (CM₂) 7,4 ng/ μL	1 μ L = 7,4 ng
Agua ultrapura	4,5 μ L
T4 ligase (Thermo scientific)	1 μ L
Buffer T4 10x	1 μ L
Volumen total	11 μ L

Tabla 4: Reacción 1: pDA CM₂-Pentasilk.

Transcurrido este tiempo, se realiza la transformación bacteriana con la cepa de *E. coli* XL1-Blue COMPETENT GRADE (punto 4.2.7). Tras la incubación de 16 horas a 37°C se observa el crecimiento de colonias aisladas, y se seleccionan aleatoriamente algunas de ellas para analizar el resultado del clonaje. Se realiza la extracción y purificación de DNA plasmídico (punto 4.2.3). El DNA plasmídico se somete a una digestión de diagnóstico para poder evaluar el tamaño del inserto clonado. Se realiza una digestión del DNA purificado con la enzima *EcoRI*, esta enzima escinde la cadena de DNA separando el vector pDrive All del fragmento de interés (inserto), añadiendo 100 pares de bases al inserto correspondientes al pDrive All, y se realiza una electroforesis analítica para comprobar el resultado de la transformación.

Se puede observar en la Figura 22 el resultado positivo de la ligación, en la calle 4 se presenta el pDA Pentasilk digerido con *EcoRI*, que se usa como referencia para corroborar si el inserto CM₂ se ha ligado correctamente. Se puede observar una banda a 4000 pb que corresponde al pDA. La banda correspondiente al plásmido CM₂-Pentasilk (4263 pb), en las calles 1, 2 y 3 ha migrado a un número de pares de bases más altas que la de la calle 4, por lo que la ligación ha resultado potencialmente positiva. La banda a 8000 pb se corresponde a una ligación parcial del plásmido al ser digerido con *EcoRI*.

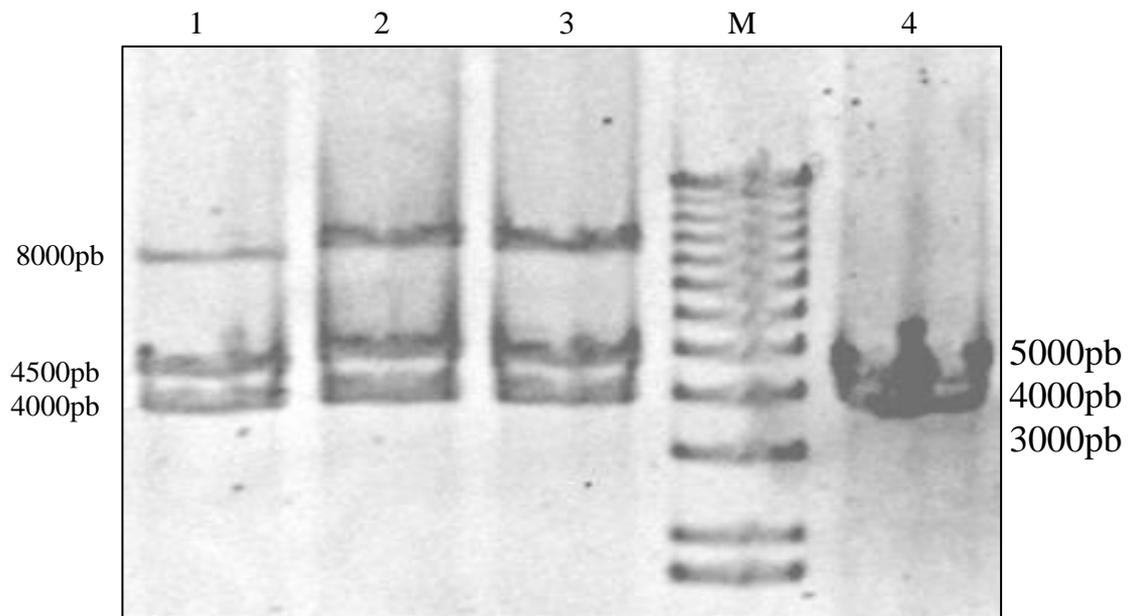


Figura 22: Electroforesis en gel de agarosa 0,5%. Reacción 1 pDA CM₂-Pentasilk. Calle 1: DNA de Colonia 2 pDA CM₂-Pentasilk digerido con *EcoRI*. Calle 2: DNA de Colonia 9 pDA CM₂-Pentasilk digerido con *EcoRI*. Calle 3: DNA de Colonia 10 pDA CM₂-Pentasilk digerido con *EcoRI*. M: Marker 1kb plus DNA Ladder. Calle 4: pDA Pentasilk digerido con *EcoRI*.

Se secuencía (punto 4.2.10.3) el DNA de clones potencialmente positivos y se corrobora la exactitud de la clonación (Figura 23 y 24).

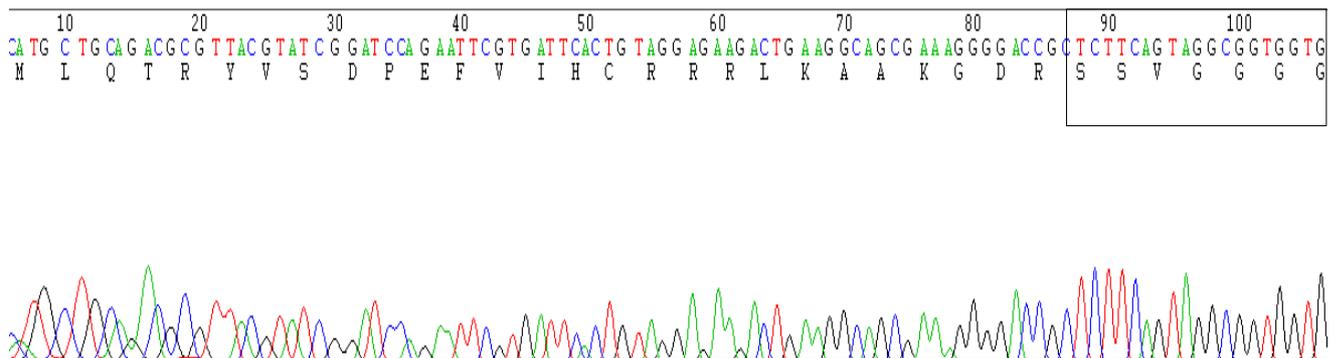


Figura 23: Cromatograma de parte de la secuenciación del pDA CM₂-Pentasilk en el punto de unión pDA-CM₂.

Reacción 1-1: pET7 TGF β CM ₂ -Pentasilk	
Plásmido (pET7 TGF β) 30,5 ng/ μ L	2 μ L = 61 ng
Inserto (CM ₂ -Pentasilk) 5,9 ng/ μ L	11 μ L = 64,9 ng
Agua ultrapura	0 μ L
T4 ligase (Thermo scientific)	1 μ L
Buffer T4 10x	1 μ L
Volumen total	15 μ L

Tabla 5: Reacción 1-1: pET7 TGF β CM₂-Pentasilk.

Se realiza la transformación bacteriana con la cepa de *E. coli* XL1-Blue COMPETENT GRADE. Tras la incubación a 37°C durante 16 horas se obtienen colonias aisladas. Se extrae y purifica el DNA de las colonias y por digestión analítica con *DpnI* se realiza una electroforesis de diagnóstico que se muestra en la Figura 25.

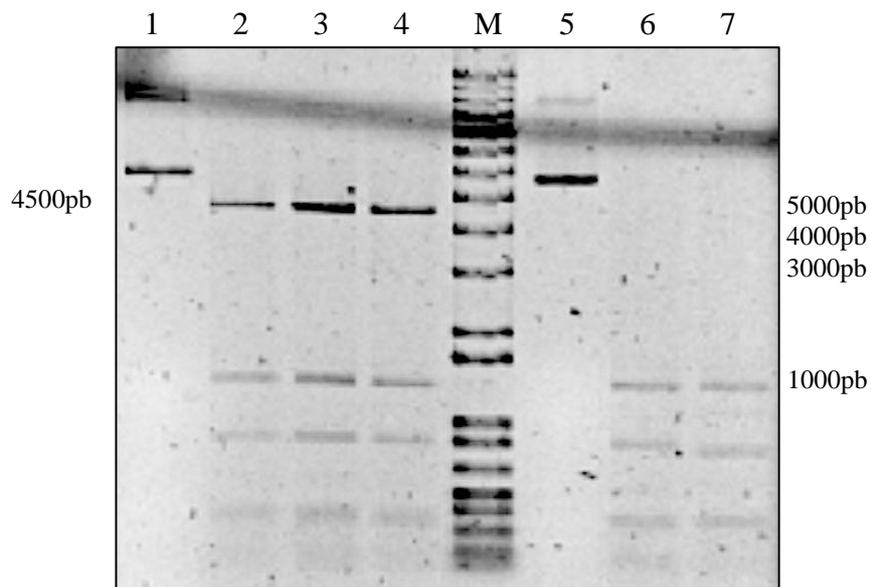


Figura 25: Electroforesis en gel de agarosa 0,5%. Reacción 1-1: pET7 TGF β CM₂-Pentasilk. Gel de agarosa 0,5%. Calle 1: pET7 RARE CCPC no digerido. Calle 2: DNA de Colonia 4 de pET7 TGF β CM₂-P digerido con *DpnI*. Calle 3: DNA de Colonia 5 de pET7 TGF β CM₂-P digerido con *DpnI*. Calle 4: DNA de Colonia 6 de pET7 TGF β CM₂-P digerido con *DpnI*. M: Marker 1 kb plus DNA Ladder. Calle 5: pET7 TGF β CM₂-P no digerida. Calle 6 y Calle 7: pET7 TGF β digerido por *DpnI*.

En las Calles 2, 3 y 4 se observa el resultado de la digestión diagnóstica. Se identifica la banda correspondiente al inserto CM₂-Pentasilk de 4500 pb. Este gen no contiene ninguna secuencia reconocida por *DpnI*. Por debajo de 1000 pb se observa el producto de la fragmentación del plásmido pET7 TGF β al digerirlo con *DpnI*, que podemos compararlo con los resultados obtenidos en las calles 6 y 7 en los cuales el inserto contenido no es identificable por tamaño (21 pb). La digestión con la enzima de restricción *DpnI* determina en este caso, la fragmentación únicamente del vector. Los clones analizados poseen un plásmido que presenta un resultado potencialmente positivo, por lo que el DNA se envía a secuenciar, se analizan los cromatogramas y se observa que el inserto CM₂-Pentasilk no se ha introducido de forma correcta, puede ser debido a que el plásmido pET7 TGF β linearizado con *SapI* no se haya defosforilado correctamente, por lo que la unión del inserto CM₂-Pentasilk no se ha producido satisfactoriamente. La reacción de defosforilación de los extremos 5' generados en la digestión es una reacción crítica para determinar una correcta clonación. La defosforilación se realiza para evitar la recirculación del plásmido lineal en los vectores usados y aunque se suelen realizar dos reacciones consecutivas de defosforilación, con enzimas de distintas casas comerciales, el proceso sigue teniendo una baja eficiencia.

Se repite por tanto la preparación del plásmido: la digestión del vector con *SapI*, defosforilación, purificación y la ligación según la reacción 1-2 de la Tabla 6:

Reacción 1-2: pET7 TGF β CM₂-Pentasilk	
Plásmido (pET7 TGF β) 31,9 ng/ μL	2 μL = 63,8 ng
Inserto (CM₂-Pentasilk) 5,9 ng/ μL	11 μL = 64,9 ng
Agua ultrapura	0 μL
<i>T4 ligase</i> (Thermo scientific)	1 μL
Buffer T4 10x	1 μL
Volumen total	15 μL

Tabla 6: Reacción 1-2: pET7 TGF β CM₂-Pentasilk.

Se realiza la transformación bacteriana en la cepa de *E. coli* XL1-Blue COMPETENT GRADE. Tras la incubación se obtienen colonias aisladas. Se extrae y purifica el DNA de tres colonias, se realiza una digestión con la enzima *DpnI* y una electroforesis de diagnóstico que se muestra en la Figura 26.

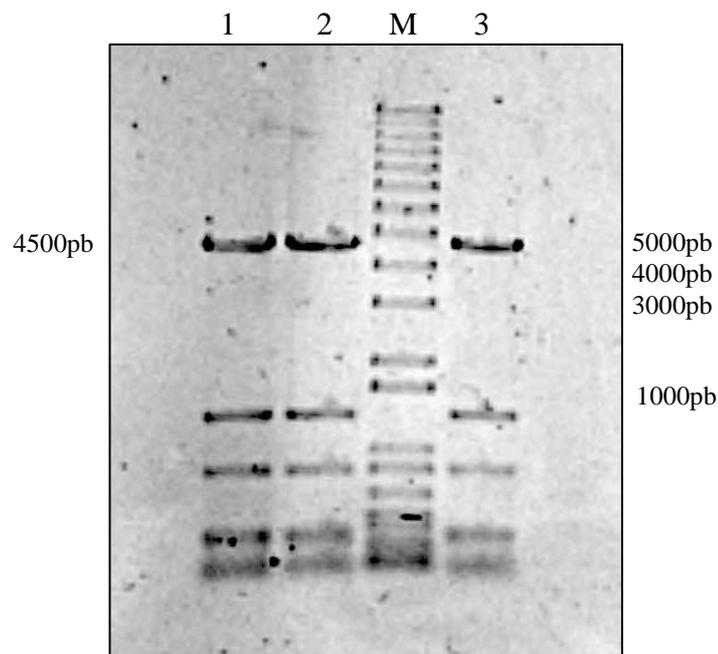


Figura 26: Electroforesis en gel de agarosa 0,7%. Reacción 1-2: pET7 TGF β CM₂-Pentasilk. Calle 1: DNA de Colonia 1 de pET7 TGF β CM₂-P digerido con *DpnI*. Calle 2: DNA de Colonia 2 de pET7 TGF β CM₂-P digerido con *DpnI*. M: Marker 1 kb plus DNA Ladder. Calle 3: DNA de Colonia 3 de pET7 TGF β CM₂-P digerido con *DpnI*.

En las Calles 1, 2, 3 se observa la banda correspondiente al inserto CM₂-Pentasilk a 4500 pb. Por debajo de 1000 pb se observa la fragmentación del plásmido pET7 TGF β al digerirlo con *DpnI*. Por lo que las colonias presentan un resultado potencialmente positivo, se envían a secuenciar las muestras ya que a simple vista sobre las electroforesis no podemos afirmar la positividad de la transformación. Como se puede observar comparando la Figura 25 y la Figura 26, ambas electroforesis presentan un resultado muy similar, que solo tras el estudio de los cromatogramas (Figura 27 y 28) podemos observar su resultado satisfactorio.

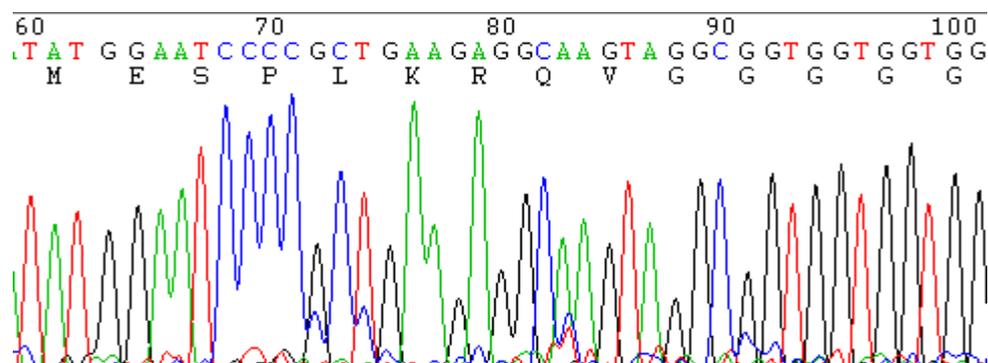


Figura 27: Cromatograma de parte de la secuenciación pET7 TGF β CM₂-P extremo T7 promotor en el punto de unión pET7-CM₂.

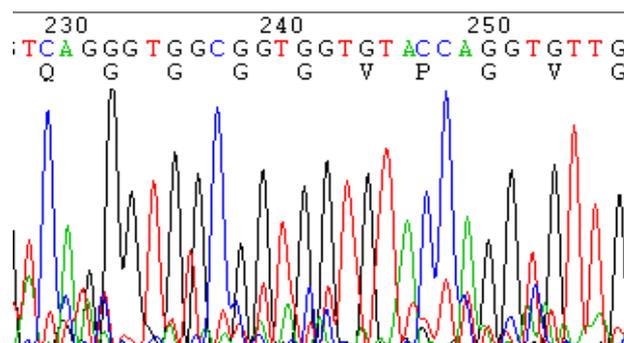


Figura 28: Cromatograma de parte de la secuenciación pET7 TGF β CM₂-P en el punto de unión de CM₂-Pentasilk.

En la Figura 27 se puede ver la secuencia del pET7 TGF β y acto seguido el comienzo del fragmento CM₂ (VGGGGG), y en la figura 28 se observa la terminación del CM₂ (QGGGG) y el comienzo del Pentasilk (VPGVG). Por lo tanto el resultado es que el pET7 TGF β CM₂-P presentan extremo p7 terminal y promotor bien codificado, es decir que la secuencia genética que presenta esta cadena de DNA es la que nos interesa, por lo que su resultado es positivo.

5.2.2 Síntesis del plásmido que codifica el polímero 2.

La síntesis del gen pDA C₃bot-CM₂-Pentasilk-CM₂-C₃bot se realiza, en principio, como se describe en la estrategia 1 (Figura 19). Se escoge este esquema, en detrimento de la estrategia 2 ya que en este caso no es factible relacionar el vector pDA Pentasilk-CM₂-C₃bot con un tamaño de 8363 pares de bases, con el inserto C₃bot-CM₂, que presenta 252 pares de bases, para transformar y extraer el pDA CCPCC (Figura 20). Por el contrario la estrategia 1 relaciona un inserto de 4425 pares de bases con un vector de 4190 pares de bases, para obtener un polímero de 4677 pares de bases, con un peso molecular 134739, 8 MW.

Para llevar a cabo la primera clonación del pDA C₃bot-CM₂-Pentasilk-CM₂-C₃bot (pDA CCPCC) se empezó en primer lugar con la preparación de DNA plasmídico de pDA CM₂-C₃bot, secuenciada como positiva, que se digiere con *SapI* (Figura 30) y la preparación del inserto del pDA C₃bot-CM₂-P que se digiere con *EcoRI* (Figura 29). En la Figura 29 se observa como la enzima *SapI* se encarga de linearizar el plásmido que vamos a usar, aparte deja los extremos escalonados para que encajen con los generados mediante la digestión con *EcoRI*, esta digestión fragmenta el vector pDA (subunidades de 250 pb, 637 pb, 1262 pb y 1742 pb) y libera el inserto C₃bot-CM₂-P como se puede apreciar en la Figura 29.

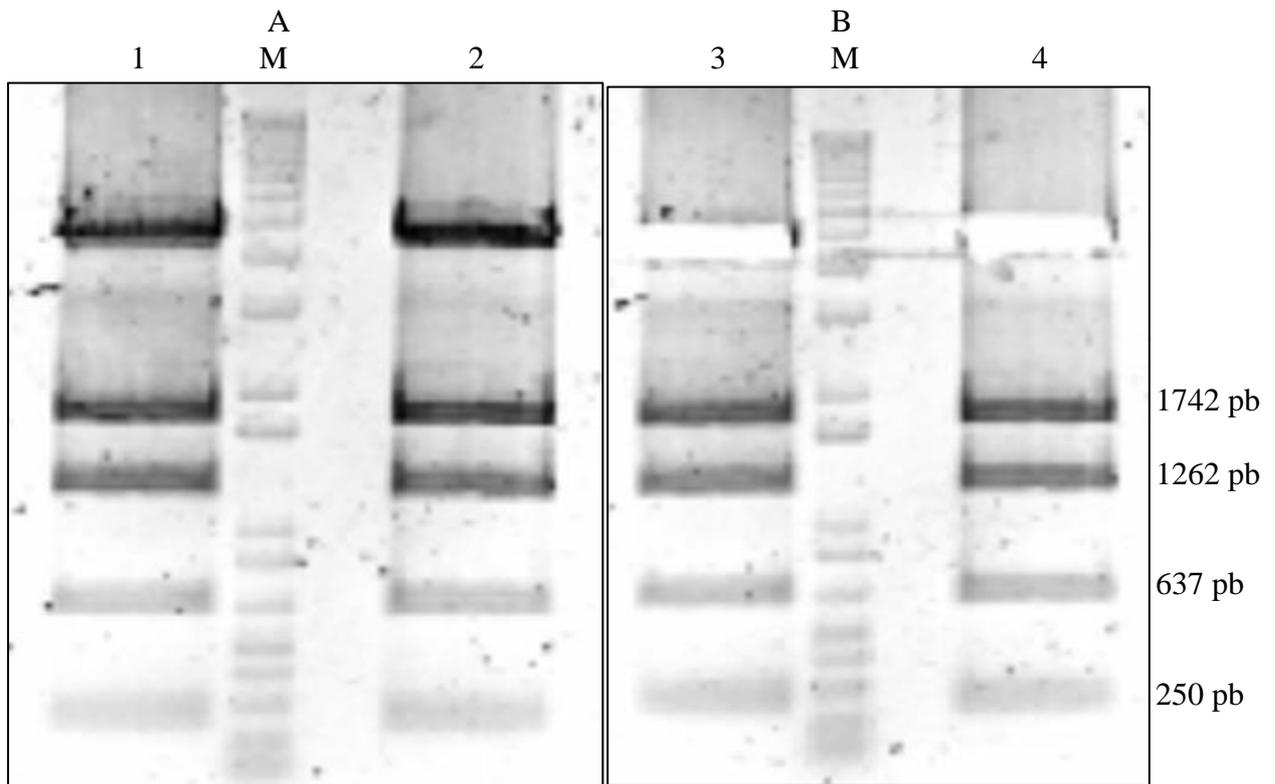


Figura 29: Electroforesis en gel de agarosa preparativo 0,75%. A) Calle 1: Digestión pDA C₃bot-CM₂-P con *EarI*. M: Marker 1kb plus DNA Ladder. Calle 2: Digestión pDA C₃bot-CM₂-P con *EarI*. B) Calle 3: Corte del inserto C₃bot-CM₂-P de la calle 1. Calle 4: Corte del inserto C₃bot-CM₂-P de la calle 2.

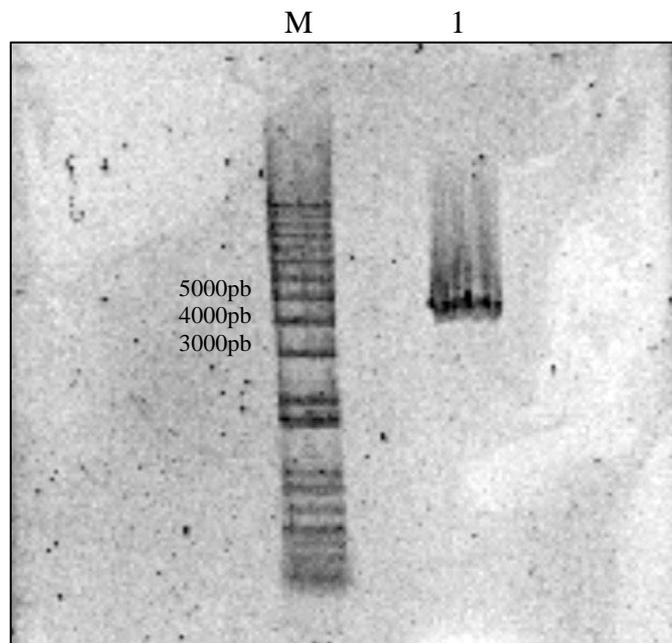


Figura 30: Electroforesis en gel de agarosa 0,7%. M: Marker 1kb plus DNA Ladder. Calle 1: Digestión con *SapI* de DNA de la colonia 6 correspondiente al vector pDA CM₂-C₃bot.

Una vez preparado el DNA plasmídico y el inserto (punto 4.2.4), se lleva a cabo la clonación según las condiciones de la Tabla 7.

Reacción 2 estrategia 1: pDA CCPCC	
Plásmido (pDA CM₂-C₃bot) 8,5 ng/ µL	3 µL= 25,5ng
Inserto (C₃bot-CM₂-P) 17 ng/ µL	5 µL = 125 ng
Agua ultrapura	0 µL
T4 ligase (Thermo scientific)	1 µL
Buffer T4 10x	1 µL
Volumen total	10 µL

Tabla 7: Reacción 2 estrategia 1: pDA CCPCC.

El tiempo de incubación de la ligación es de 15 minutos a 22°C. Trascurrido este tiempo, se realiza la transformación bacteriana con la cepa de *E. coli* XL1-Blue COMPETENT GRADE (punto 4.2.7). El día siguiente observamos el crecimiento de colonias aisladas, y se eligen algunas de ellas para analizar el resultado del clonaje. Se realiza la extracción y purificación de DNA. Se realiza una digestión del DNA purificado con la enzima *EcoRI*. El resultado se muestra en Figura 31.

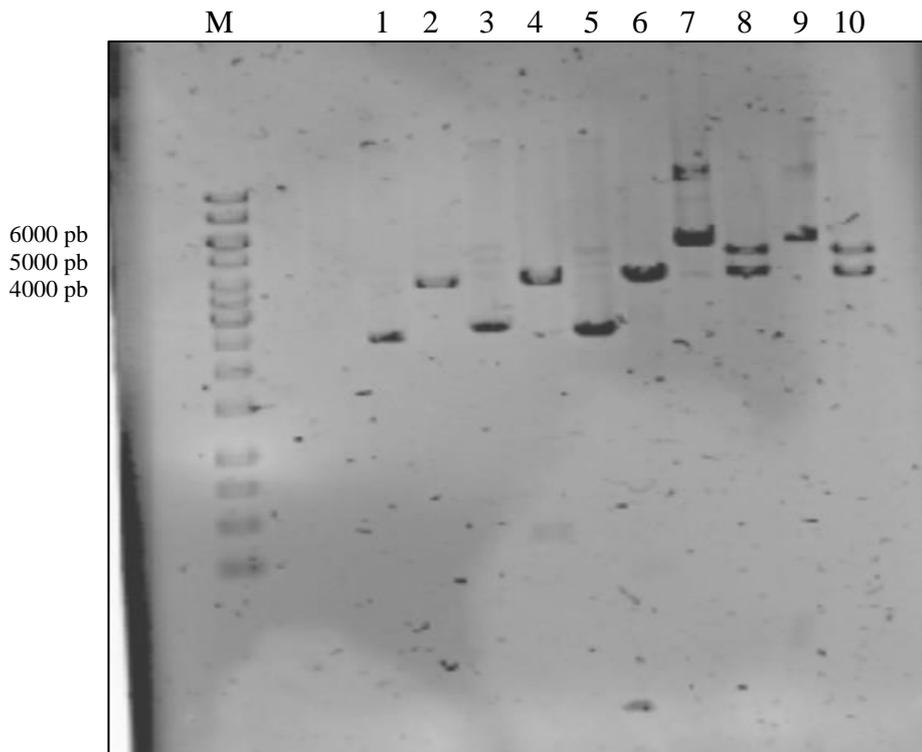


Figura 31: Electroforesis en gel de agarosa 0,75%. Reacción 2 estrategia 1 pDA CCPCC. M: Marker 1 kb DNA Ladder. Calle 1: DNA de Colonia 4 no digerida. Calle 2: DNA de Colonia 4 digerida con *EcoRI*. Calle 3: DNA de Colonia 5 no digerida. Calle 4: DNA de Colonia 5 digerida con *EcoRI*. Calle 5: DNA de Colonia 6 no digerida. Calle 6: DNA de Colonia 6 digerida con *EcoRI*. Calle 7: DNA de Colonia 7 no digerida. Calle 8: DNA de Colonia 7 digerida con *EcoRI*. Calle 9: DNA de Colonia 7 no digerida. Calle 10: DNA de Colonia 7 digerida con *EcoRI*.

Tras el análisis de la electroforesis se puede comentar que en las calles 7 y 9 de la Figura 31, que corresponden con la colonia 7, se observa que la muestra sin digerir (calle 7) presenta una banda a más de 12 kpb y una a 6000 pb, éstas representan 2 de las 3 formas en las que se encuentra el DNA sin digerir (punto 2.1.2). Las calles 8 y 10, que contienen la colonia 7 digerida con *EcoRI*, presentan 2 bandas al digerirse con la enzima, la de menor tamaño presenta un número de pares de bases compatible con el vector pDA (3938 pb) y la de mayor tamaño el inserto CCPCC (4677 pb+100 pb del corte con *EcoRI*), por lo que las consideramos potencialmente positivas. Las calles 2, 4 y 6, que corresponden con las colonias 4, 5 y 6, respectivamente, solo presentan la banda compatible con el vector pDA (3851 pb), por lo que la transformación en estas colonias tiene resultado negativo.

Se comprueba por secuenciación la exactitud del clonaje:

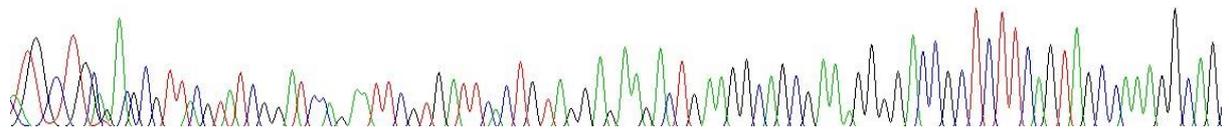
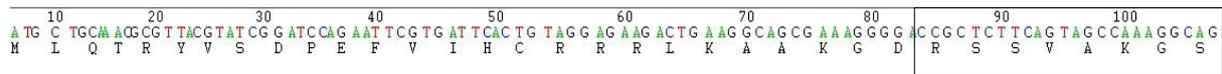


Figura 32: Cromatograma de parte de la secuenciación de pDA CCPCC en el punto de unión pDA-C₃bot.

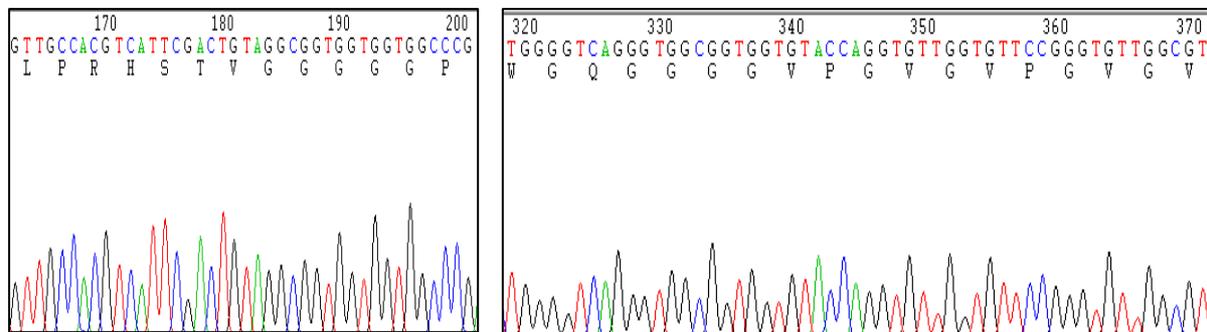


Figura 33: Cromatograma de parte de la secuenciación de pDA CCPCC. A la izquierda: el punto de unión C₃bot-CM₂; a la derecha: el punto de unión CM₂-Pentasilk

Así tal como se puede observar en las Figuras 32 y 33 el resultado de la secuenciación confirmó que se había clonado el gen de interés. En la Figura 32 se observa el fragmento de secuencia que corresponde con el comienzo del inserto C₃bot (VAKGS), en la Figura 33 (izquierda) se observa la unión C₃bot (PRHST)-CM₂ (VGGGGG) y para finalizar en la Figura 33 (derecha) se puede observar la unión CM₂ (QGGGG)-Pentasilk (VPGVG). Una vez controlado el producto en el pDrive se busca subclonarlo en el vector pET7 RARE para la producción del polímero *a posteriori* (punto 4.1.4), pero al introducirlo en el vector pET7 RARE y enviarlo a secuenciar, el resultado es que el extremo C terminal de la cadena de DNA es erróneo. Por lo que se recomienza con la estrategia de ligación.

Se repite la reacción 2 estrategia 1 cambiando distintos factores: a) desde el **tiempo de incubación** en la etapa de clonación, variando desde 15 minutos hasta 16 horas la incubación de la ligación; b) **la temperatura de incubación**, jugando con temperaturas desde 4°C (en tiempos de incubación largos) hasta 22°C; c) **cambio de las alícuotas** que se preparan de

DNA plasmídico y de inserto, d) **la cantidad de *T4 ligasa*** que se añade a la clonación. Pese a todos los factores distintos utilizados no se ha conseguido sintetizar el gen correspondiente al polímero 2.

Por lo que se pone en práctica la estrategia 2 (punto 5.1.2), aunque como se ha dicho con anterioridad no sea el camino más fácil. Se usa como inserto el C₃bot-CM₂ (252 pb correspondiente a 7271,05 MW de la secuencia proteica) y como plásmido el pDA Pentasilk-CM₂-C₃bot (8363 pb correspondiente a 127503,2 MW de la secuencia proteica). Dado que el inserto C₃bot-CM₂ ya se tiene digerido con *Earl*, esta clonación se comienza con la digestión del vector pDA Pentasilk-CM₂-C₃bot con *SapI*. Se tienen dos colonias del pDA Pentasilk-CM₂-C₃bot por lo que se procede a realizar la digestión de ambas colonias en dos distintas condiciones, se harán dos alícuotas de las dos colonias, 1 µg en los 4 casos, una se digiere con 1 µL de *SapI* y la otra con 1,5 µL de la misma enzima. Esto se realiza para utilizar las condiciones óptimas del enzima que se encuentran en este rango, ya que la enzima fuera de su rango óptimo no es eficiente. No porque se añada más cantidad de enzima, a una misma cantidad de DNA, la digestión se realizará mejor o más rápido. Seguidamente se realiza una electroforesis analítica para comprobar la digestión. (Figura 34)

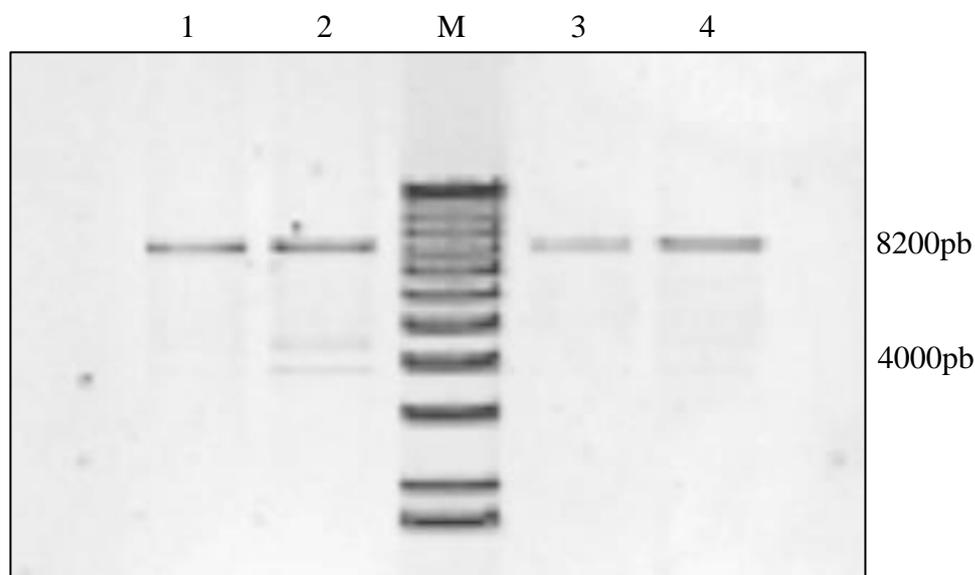


Figura 34: Electroforesis en gel de agarosa 0,7%. Calle 1: DNA de Colonia 1 de pDA PCC digerida con 1 µL de *SapI*. Calle 2: DNA de Colonia 1 de pDA PCC con 1,5 µL *SapI*. M: Marker 1 kb plus DNA Ladder. Calle 3: DNA de Colonia 2 de pDA PCC con 1 µL de *SapI*. Calle 4: DNA de Colonia 2 de pDA PCC con 1,5 µL de *SapI*.

El resultado es una digestión total en los casos que se ha digerido con 1 μL de *SapI*, tal como se observa en la Figura 34. La banda a 8200 pb corresponde al pDA PCC. En las calles 2 y 4 se pueden observar 2 bandas sobre 4000 pb, estas corresponden al vector pDA y al PCC, por lo que se ha producido una digestión parcial en los casos que se ha aumentado la cantidad de enzima hasta 1,5 μL . Por lo tanto, aumentando la concentración de la enzima en las condiciones descritas, esta pierde parcialmente la especificidad de reconocimiento de la secuencia. Está descrito en la literatura que estas poderosas herramientas de la ingeniería genética, es decir las enzimas de restricción, presentan algunas desventajas. Si se alteran las condiciones de reacción tales como temperatura, tiempo de incubación, composición o concentración de los componentes se puede perder actividad o especificidad. Dependiendo de las condiciones algunas enzimas de restricción son capaces de escindir secuencias similares, pero no idénticas, a su secuencia de reconocimiento.

Se realiza la clonación, usando un tiempo de incubación de la ligación de 5 horas a 22°C y se siguen tres condiciones experimentales de reacción, indicadas como 1, 2 y 3 en la Tabla 8, utilizando a distintas concentraciones y proporciones; siempre dentro de los rangos sugeridos por la casa comercial. Existen varias variables que influyen en la eficiencia de reacción, por ejemplo la relación molar de los fragmentos a unir, en esta estrategia se trabaja con el pDA Pentasilk-CM₂-C₃bot (8363 pb) y como inserto el C₃bot-CM₂ (252 pb), que presentan mucha diferencia de tamaños entre ellos, por lo que se realizan distintas relaciones molares entre los fragmentos.

Reacción 2 estrategia 2: pDA CCPCC				CONTROL
	1	2	3	
Proporción	5:1	3:1	5:1	
Plásmido (pDA PCC) 11,8 ng/ μL	1,36 μL = 16,02 ng	6 μL = 70ng	6 μL = 70 ng	1,36 μL = 16.02 ng
Inserto (C₃bot-CM₂) 6,5ng/μL	0.38 μL = 2,5 ng	1 μL = 6,5 ng	1,64 μL = 10,66 ng	0 μL
Agua ultrapura	5,76 μL	0,5 μL	0 μL	6,14 μL
Buffer t4	1,5 μL	1,5 μL	1,5 μL	1,5 μL
T4 ligase (Thermo Scientific)	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL
Volumen total	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL

Tabla 8: Reacción 2 estrategia 2: pDA CCPCC.

Se induce la transformación en la cepa de *E. coli* XL1-Blue COMPETENT GRADE y tras la incubación, a 37°C durante 16 horas en placas Petri, solo se producen colonias aisladas en la reacción 1 de la tabla 8. Se realiza una electroforesis analítica para comprobar el resultado de la transformación.

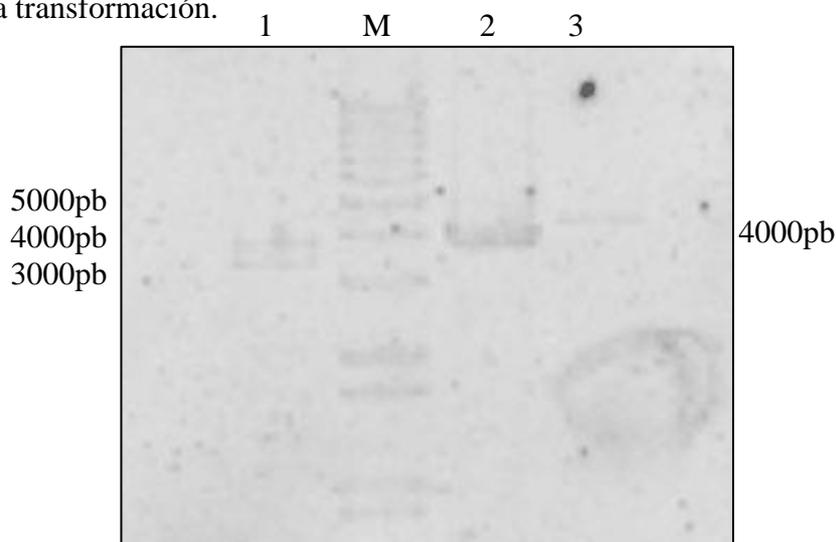


Figura 35: Electroforesis en gel de agarosa 0,7%. Reacción 2 estrategia 2 pDA CCPCC. Calle 1: DNA de Colonia 1 digerida con *EcoRI*. M: Marker 1 kb plus DNA Ladder. Calle 2: DNA de Colonia 3 digerida con *EcoRI*. Calle 4: DNA de Colonia 5 digerida con *EcoRI*.

El resultado de la ligación es negativo, ya que no se observa ninguna banda a 4700 pb que sería la correspondiente al gen CCPCC, solo aparece la correspondiente al vector pDA (3851 pb). Debido al resultado negativo se hace una nueva estrategia de clonación en el que se repite la digestión (linearización) del plásmido cambiando el tiempo de incubación a 1 hora a 22°C. Se realiza una clonación con las mismas proporciones que las correspondientes a la reacción 1 de la Tabla 8, en la que se habían producido colonias aisladas.

Reacción 2 estrategia 2 (bis): pDA CCPCC	
Plásmido (pDA PCC) 8 ng/ μL	2 μ L = 16 ng
Inserto (C₃bot-CM₂) 6,5ng/ μL	0,38 μ L = 2,5 ng
Agua ultrapura	5,12 μ L
T4 ligase (Thermo scientific)	1 μ L
Buffer T4 10x	1,5 μ L
Volumen total	10 μ L

Tabla 9: Reacción 2 estrategia 2 (bis): pDA CCPCC.

Se produce la transformación con la cepa de *E. coli* XL1-Blue COMPETENT GRADE y tras la incubación, a 37°C durante 16 horas no se producen colonias, por lo que tras el cambio de las condiciones la clonación sigue presentando resultado negativo. A pesar de las múltiples estrategias de clonación propuestas no se ha conseguido sintetizar el polímero pDA C₃bot-CM₂-Pentasilk-CM₂-C₃bot. Este resultado negativo puede ser por distintos motivos:

- El primer motivo puede ser que el plásmido usado en un principio, el pDA CM₂-C₃bot esté parcialmente degradado, es decir, que la enzima encargada de la defosforilación haya actuado con una acción exonucleásica determinando la eliminación de las extremidades cohesivas necesarias para el clonaje. Esta actividad enzimática secundaria está descrita para la enzima. Teniendo en cuenta esta posibilidad se propuso llevar a cabo la segunda estrategia de clonación (punto 5.1.2), pero sin obtener resultados positivos.

- Otro motivo pueden ser las condiciones a las que se lleva a cabo la ligación, desde el tiempo y la temperatura de incubación en la etapa de ligación hasta la cantidad de enzima *T4 ligasa* que se ha utilizado. Aunque se han usado tiempos de incubación muy variables, desde 15 minutos hasta 16 horas, a distintas temperaturas de incubación y volúmenes variables de *T4 ligasa* desde 1 unidad hasta 5 unidades, es posible que no se hayan encontrado las condiciones óptimas de reacción.

- Por otra parte, se han intentado usar distintos plásmidos de diferentes concentraciones y distintos insertos, por si los resultados negativos fueran causa de un mal aislamiento de la materia prima utilizada. Aún después de estas variaciones, no se ha llegado a sintetizar el plásmido pDA C₃bot-CM₂-Pentasilk-CM₂-C₃bot.

5.2.3 Síntesis del plásmido que codifica al polímero 3.

La síntesis del plásmido pDA C₃bot-Pentasilk que presenta 8201 pares de bases correspondiente a un peso molecular del polímero de 123301,05 MW, se realiza por la estrategia propuesta en el punto 5.1.3. No se tuvieron que realizar digestiones preparativas ya que se poseían los vectores y los insertos necesarios. El tiempo de incubación es de 15 minutos a 22°C. Se produce la reacción de ligación siguiendo las condiciones de la Tabla 10.

Reacción 3: pDA C ₃ bot-Pentasilk	
Plásmido (pDA Pentasilk) 10,8 ng/ μ L	3 μ L = 32,4 ng
Inserto (C ₃ bot) 5 ng/ μ L	0,5 μ L = 2,5 ng
Agua ultrapura	5 μ L
T4 ligase (Thermo scientific)	1 μ L
Buffer T4 10x	1 μ L
Volumen total	11 μ L

Tabla 10: Reacción 3: pDA C₃bot-Pentasilk.

Se realiza la transformación bacteriana con la cepa de *E. coli* XL1-Blue COMPETENT GRADE. Tras la incubación se obtienen colonias aisladas. Se extrae y purifica el DNA. Se realiza una electroforesis analítica para comprobar la ligación (Figura 36).

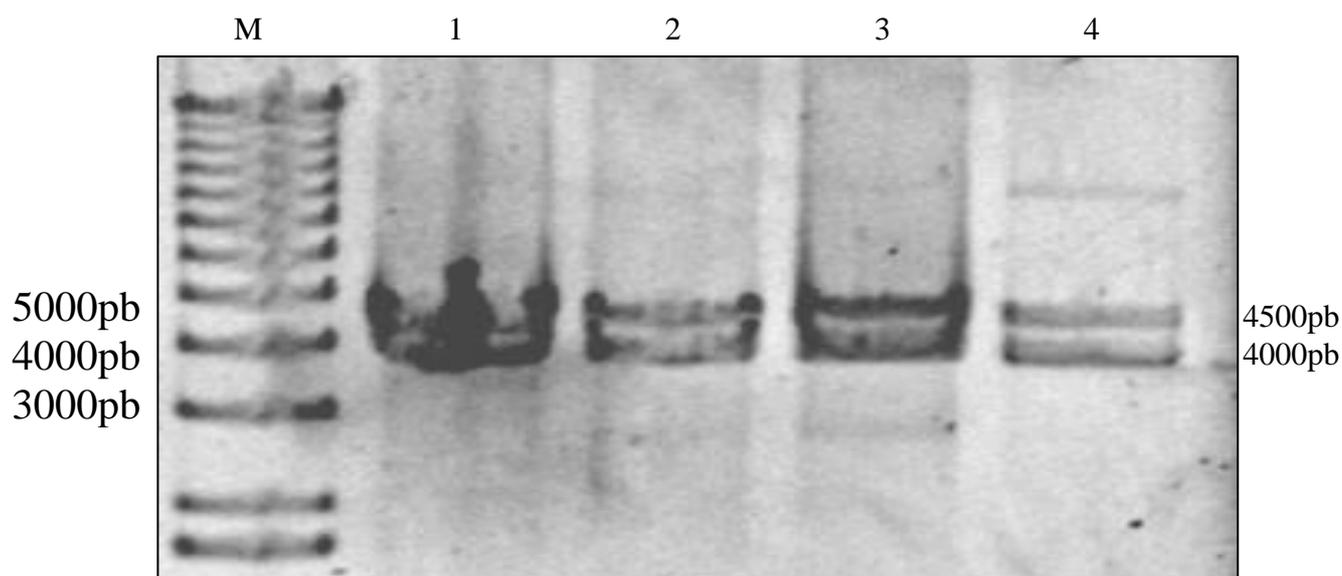


Figura 36: Electroforesis en gel de agarosa 0,5%. Reacción 3: pDA C₃bot-Pentasilk. M: Marker 1 kb plus DNA Ladder. Calle 1: pDA Pentasilk digerido con *EcoRI*. Calle 2: DNA de Colonia 4 pDA C₃bot-Pentasilk digerido con *EcoRI*. Calle 3: DNA de Colonia 7 pDA C₃bot-Pentasilk digerido con *EcoRI*. Calle 4: DNA de Colonia 11 pDA C₃bot-Pentasilk digerido con *EcoRI*.

La banda a 4000 pb representa al pDA. La banda a la altura de 4500 pb corresponde con el inserto, introducido en el vector pDA, C₃bot-Pentasilk (4335 pb), ya que migra a mayor número de pares de bases que la de la calle 1 que es el Pentasilk sin el inserto (4173pb). El

DNA se envía a secuenciar y los resultados de la secuenciación se muestran en las Figuras 37 y 38.

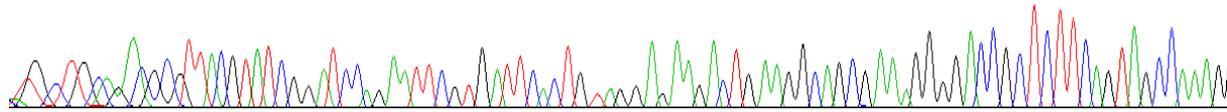


Figura 37: Cromatograma de parte de la secuenciación de pDA C₃bot-Pentasilk en el punto de unión pDA-C₃bot.

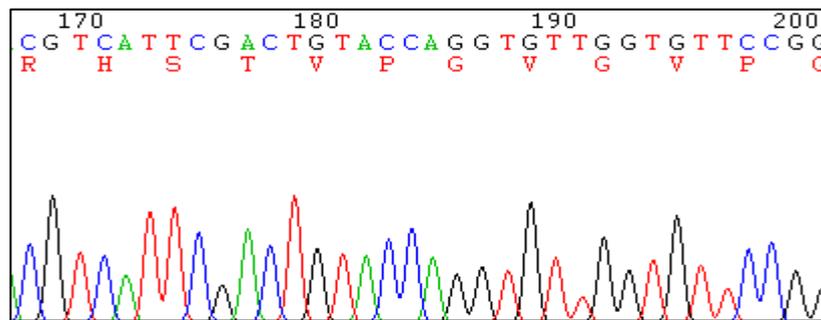


Figura 38: Cromatograma de parte de la secuenciación de pDA C₃bot-Pentasilk en el punto de unión C₃bot-Pentasilk.

Los cromatogramas de las Figuras 37 y 38 presentan las secuencias en el punto de unión de los distintos bloques que forman el polímero, se puede observar que las secuencias son correctas por lo que las colonias transformadas presentan un resultado positivo.

Una vez que está corroborado el carácter positivo del pDA C₃bot-Pentasilk, se le introduce en un vector de expresión. En este caso se clonará el pET7 RARE con el inserto C₃bot-Pentasilk (punto 4.1.4).

Para llevar a cabo el proceso de clonación primero se produce la digestión con *SapI* del vector pET7 RARE y con *EcoRI* del plásmido C₃bot-Pentasilk. La estrategia de clonación para introducir el inserto en el pET7 RARE se realiza siguiendo las condiciones experimentales mostradas en la Tabla 11.

Estrategia 3: pET7 RARE C ₃ bot-Pentasilk	
Plásmido (pDA pET7 RARE) 4,3 ng/ μ L	5 μ L = 21,5 ng
Inserto (C ₃ bot-Pentasilk) 13,3 ng/ μ L	8 μ L = 106.4 ng
Agua ultrapura	0 μ L
T4 ligase (Thermo scientific)	1 μ L
Buffer T4 10x	1 μ L
Volumen total	15 μ L

Tabla 11: Reacción 3: pET7 RARE C₃bot-Pentasilk.

La reacción ligación se incubó a 22°C durante 15 minutos. Se realizó la transformación bacteriana con la cepa de *E. coli* XL1-Blue COMPETENT GRADE, en este caso las placas de cultivo usadas contienen solo Ampicilina como antibiótico, al contrario que las usadas con el vector pDA que contenían Ampicilina y Kanamicina. Tras la incubación a 37°C durante 16 horas se obtienen colonias aisladas. Se extrae y purifica el DNA, y por electroforesis analítica (Figura 39) se comprueba si las colonias son positivas. La digestión se realiza con la enzima *DpnI*, esta “corta” el plásmido pET7 RARE en distintos fragmentos y lo separa del fragmento que se quiere introducir al plásmido.

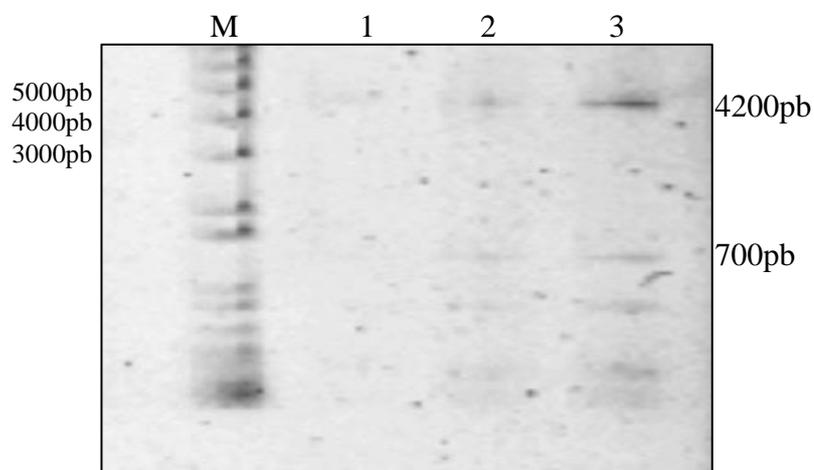


Figura 39: Electroforesis en gel de agarosa 0,6%. Reacción 3: pET7 RARE C₃bot-Pentasilk. M: Marker 1kb plus DNA Ladder. Calle 1: DNA de Colonia 1 pET7 RARE C₃bot-P digerido con *DpnI*. Calle 2: DNA de Colonia 3 pET7 RARE C₃bot-P digerido con *DpnI*. Calle 3: DNA de Colonia 5 pET7 RARE C₃bot-P digerido con *DpnI*.

La Figura 39 muestra una banda sobre 4200 pb que correspondería al fragmento C₃bot-Pentasilk. Las bandas por debajo de 700 pb corresponden a los fragmentos del vector

pET7 RARE. Se llega a la conclusión de que todas las colonias son potencialmente positivas. Se envía el DNA de las colonias a secuenciar. Los resultados de la secuenciación se muestran en las Figuras 40 y 41.

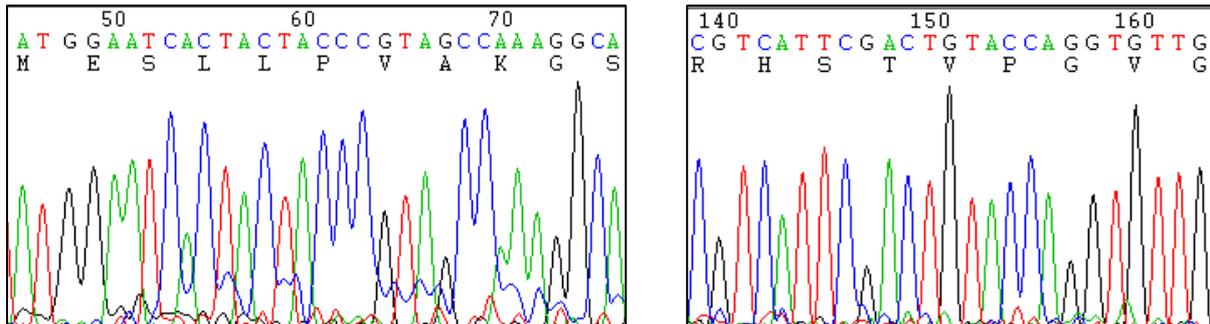


Figura 40: Cromatograma de parte de la secuenciación de pET7 RARE C₃bot-Pentasilk en el extremo T7 promotor. A la izquierda: punto de unión pET7-C₃bot; a la derecha: punto de unión C₃bot-Pentasilk.

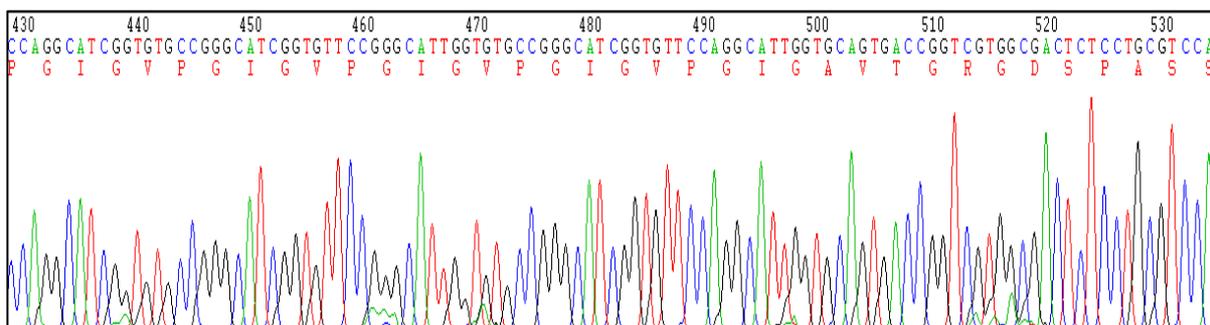


Figura 41: Cromatograma de parte de la secuenciación de pET7 RARE C₃bot-Pentasilk en el extremo T7 terminal en el dominio RGD.

El resultado es que las colonias del pET7 RARE C₃bot-Pentasilk si son correctas. El pET7 RARE C₃bot-Pentasilk presenta extremo T7 promotor bien codificado, siendo las uniones de los distintos fragmentos (Figura 40: pET7 (MESLLP)-C₃bot (VAKGS) y C₃bot (RHST)-Pentasilk (VPGVG)) las esperadas, y extremo T7 terminal (Figura 41) correcto con el dominio RGD, es decir que la secuencia genética que presenta esta cadena de DNA es la que nos interesa, por lo que su resultado es positivo.

5.3 BIOPRODUCCIÓN.

En este apartado se describe la bioproducción del polímero denominado (EIS)₂RGD₆-CM₂-C₃bot (Pentasilk-CM₂-C₃bot), que es usado para una posterior caracterización.

Para el proceso de bioproducción se utilizan dos cepas bacterianas de *E. coli*: la *BL21* y la *BLR*. Estas dos cepas son las más usadas en la expresión de las proteínas de tipo ELRs. Estas cepas son deficientes de algunas proteasas y sistemas de recombinación de ADN, estabilizando por lo tanto los productos génicos y proteicos.

Se introduce el plásmido pET7 RARE Pentasilk-CM₂-C₃bot en las dos cepas (punto 4.2.8) y las incubamos durante 16-21 horas con los antibióticos correspondientes en placas Petri. Una vez obtenidas las colonias aisladas se realiza un análisis de producción (punto 4.2.8), induciendo la expresión del polímero recombinante, en un volumen reducido de medio líquido TB. El análisis se concluye con una electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). El resultado de la electroforesis se muestra en Figura 42.

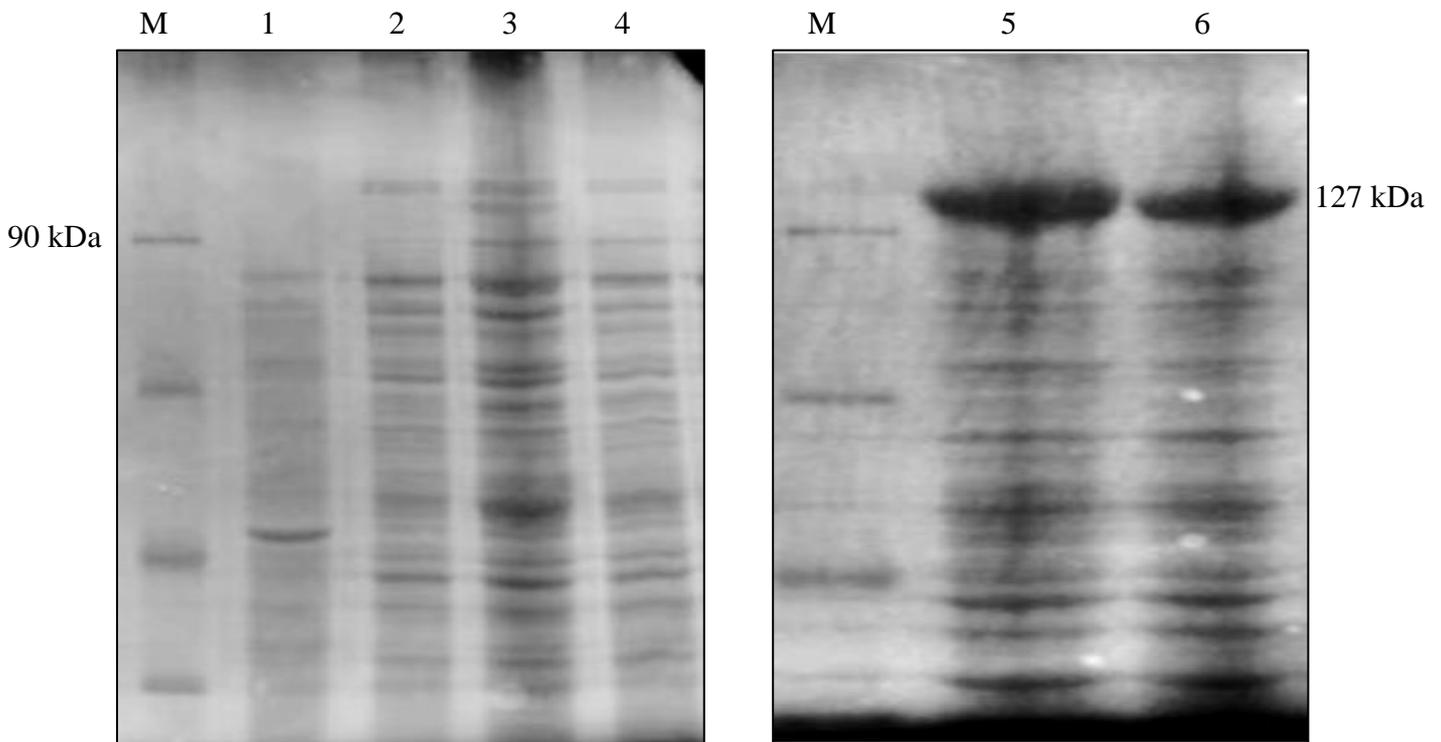


Figura 42: SDS-PAGE del extracto crudo total de las proteínas bacterianas de diferentes colonias. Expresión de proteínas del polímero Pentasilk-CM₂-C₃bot. A la izquierda: M: Marker proteico. Calle 1: Control negativo de cepa *E. coli* BL21. Calle 2, 3 y 4: Cepa *BL21* con PCC. Al a derecha Calle 5 y 6: Cepa *BLR* con PCC.

En la cepa donde se obtiene más expresión proteica es en la BLR (Figura 42 derecha), ya que por encima de 90 kDa se encuentra la banda correspondiente a nuestro polímero recombinante ELR. Esta banda es la más intensa en la cepa BLR.

Una vez que tenemos la cepa y la colonia que más expresión proteica presenta, se procede a la inoculación de las células según el punto 4.2.8, y una vez producida la fermentación se purifica obteniéndose un gel (punto 4.2.9), la proteína se liofiliza y se pesa para calcular cuál ha sido nuestra masa final de producto. En este caso, de los 15 litros (de medio e inóculo) usados en la fermentación, tras la purificación se obtienen 12,600 gramos del polímero Pentasilk-CM₂-C₃bot.

5.4 CARACTERIZACIÓN DE POLÍMEROS.

En este apartado se van a mostrar y discutir los resultados de ciertas pruebas de caracterización de un polímero ya producido y purificado, el Pentasilk-CM₂-C₃bot (PCC) y los resultados de las pruebas de secuenciación de los polímeros que hemos sintetizado durante este trabajo.

5.4.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

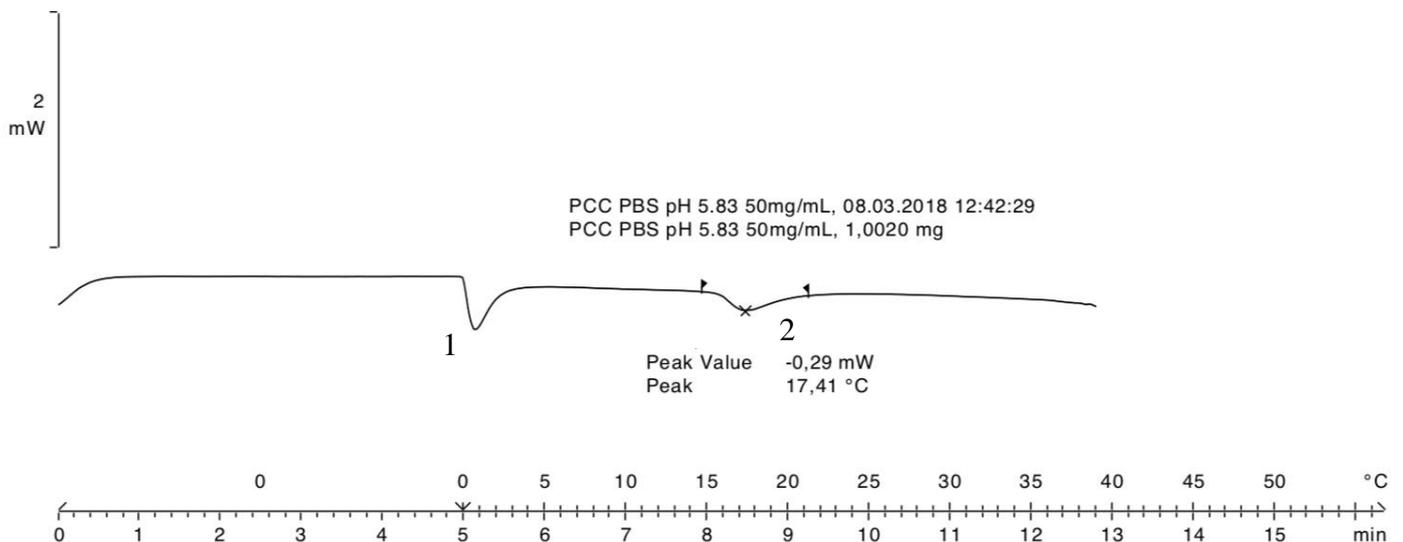


Figura 43: DSC del polímero Pentasilk-CM₂-C₃bot en PBS 1x y pH 5,83.

En la Figura 43 correspondiente al DSC del polímero Pentasilk-CM₂-C₃bot se pueden ver 2 posibles transiciones, el **punto 1** es un artefacto producido por el comienzo del aumento de la rampa temperatura, ya que el polímero se mantiene un tiempo a 0° para estabilizarse, y en el momento en el que empieza el aumento de la temperatura se produce esa variación de la recta. La variación que nos interesa es el **punto 2**, este corresponde a la temperatura de

transición de nuestro polímero, como hemos dicho en el punto 2.2.1, este tipo de polímeros tiene como característica la temperatura de transición inversa (T_i), es decir, que a temperatura baja se encuentran en estado líquido y en este caso a temperatura fisiológica en estado sólido. Por ello la temperatura de transición de nuestro polímero se identifica como el ápice del pico y corresponde a $17,41^\circ\text{C}$.

5.4.2 Resonancia magnética nuclear (RMN).

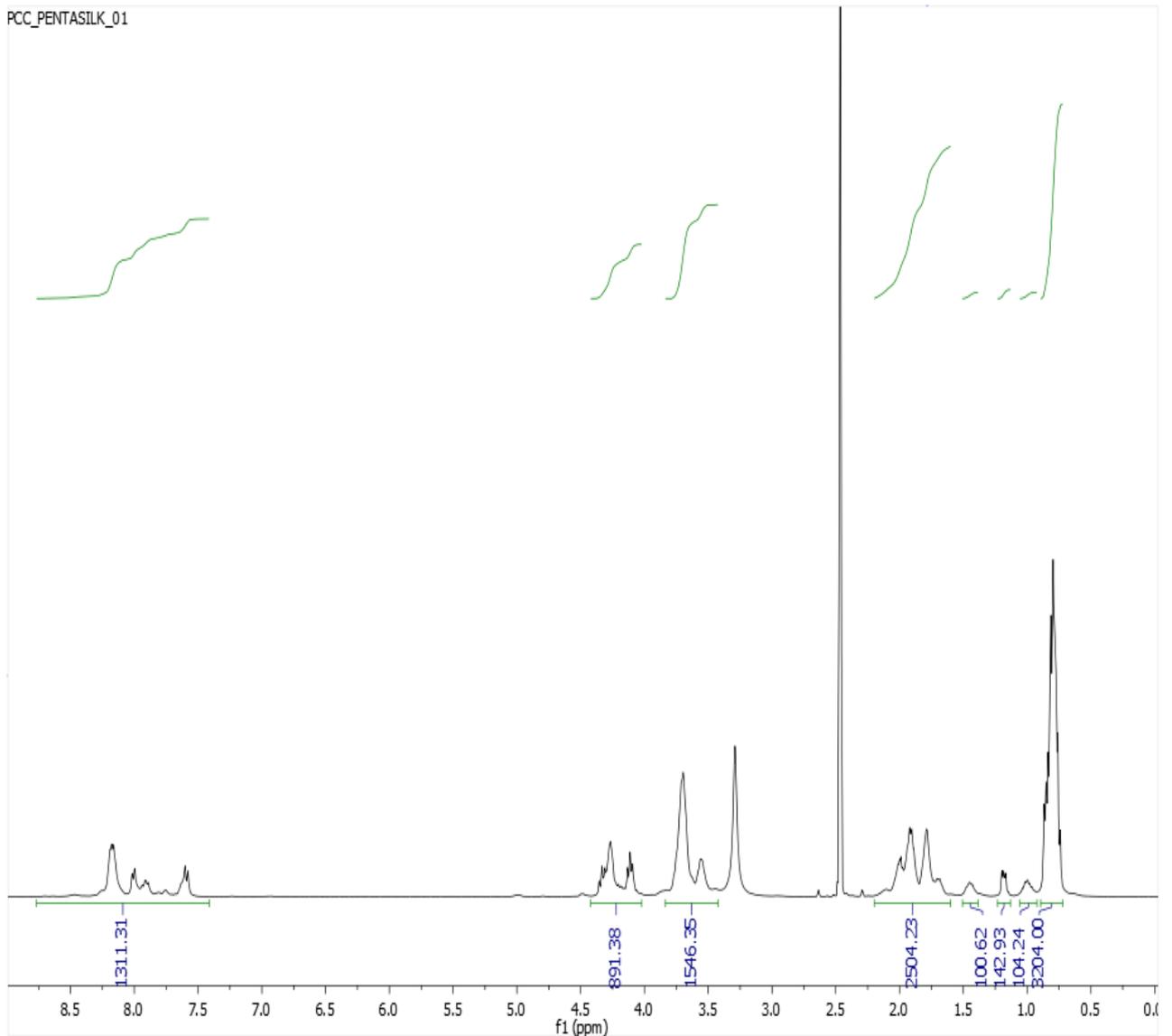


Figura 44: RMN de protón del polímero Pentasilk-CM₂-C₃bot.

Se realiza un RMN de protón del polímero Pentasilk-CM₂-C₃bot (Figura 44) para comprobar si el número de ^1H que contiene la estructura según sus aminoácidos se corresponde a la señal que nos da el RMN.

Este estudio se realiza a través de un contador de aminoácidos que nos da los grupos funcionales de cada aminoácido.

Contador de Aminoácidos									
N° Aminoácidos	CH ₃	CH α	CH	CH ₂	Aromático	NH	OH	Ácido	PMolecular
1532	3204	920	508	3402	21	1317	50	28	127503,21

Tabla 12: Contador de Aminoácidos.

Se utiliza como referencia el primer pico (0,75 ppm), correspondiente a los metilos de la estructura que integra 3204. Con esta referencia se da un valor al resto de las integrales de la Figura 44.

Los CH α aparecen a 4,25 ppm e integrando 891,8, si lo comparamos con los CH α que tenemos en el polímero Pentasilk-CM₂-C₃bot estos concuerdan ya que presenta 920 CH α .

El intervalo de picos entre 3,5-4 ppm y 1-2,25ppm corresponde a los CH y CH₂, ya que equivalen con la suma de los CH y CH₂ calculados por el contador que presenta el polímero Pentasilk-CM₂-C₃bot.

Por último el intervalo de 7,5-8,5 ppm que integra 1311, que en estructuras de pequeño tamaño correspondería a estructuras con carácter aromático, corresponde tanto a aromáticos como a aminas.

En este tipo de estructuras que contienen ácidos carboxílicos, estos no suelen aparecer en el RMN.

Con esta prueba se observa que la composición del polímero obtenido experimentalmente es bastante similar a la obtenida de forma teórica.

5.4.3 Espectroscopía de Masas.

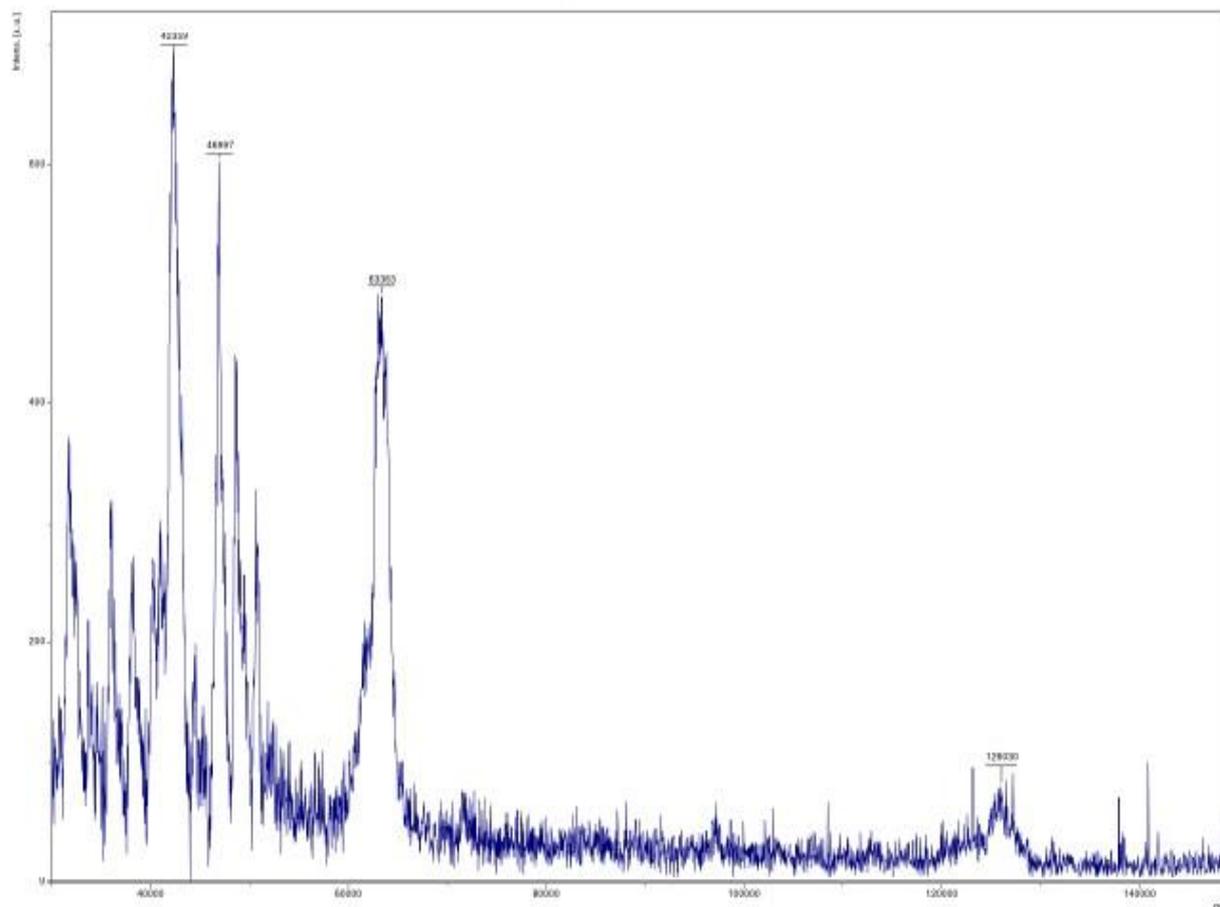


Figura 45: Espectro de masas del polímero Pentasilk-CM₂-C₃Bot.

En la Figura 45 se muestra el Espectro de masas del polímero Pentasilk-CM₂-C₃Bot. Presenta un pico minoritario a 126030 umas, correspondiente al peso molecular de la primera ionización de nuestro polímero. Aparecen 3 picos correspondientes a la segunda, tercera y cuarta ionización del polímero, uno a 63363 umas, 46997 y 42358 umas, siendo la cuarta ionización la de mayor intensidad.

6. CONCLUSIÓN.

1. Al fin de obtener nuevos biomateriales con capacidad neuro-regenerativa, se han diseñado polímero proteicos, recombinantes tipo elastina (ELR). Se ha realizado la construcción de los genes recombinantes a partir de genes independientes contenidos en diferentes vectores de clonación pDrive ALL, estos llevan fragmentos de genes que codifican por: i) estructuras moleculares que confieren propiedades mecánicas adecuadas (Pentasilk), ii) secuencia para modular su degradación (CM₂) y iii) péptido con capacidad neuroregenerativa (C₃bot). Para que el fragmento bioactivo C₃bot pueda ser funcional *in vivo*, se ha interpuesto una secuencia que contiene motivos diana de metaloproteasas específicas del tejido neuronal en la fase aguda de reparación del daño. Los plásmidos obtenidos son pDA C₃bot-Pentasilk y pDA CM₂-Pentasilk.
2. La construcción del vector pDA C₃bot-CM₂-Pentasilk-CM₂-C₃bot no ha sido aislada pese a los intentos realizados y a las estrategias seguidas para su realización, esto es debido: a un mal aislamiento del gen primario para realizar la transformación o a un error de las posibles condiciones de trabajo.
3. Se ha llevado a cabo la introducción de los insertos de DNA C₃bot-Pentasilk y CM₂-Pentasilk, que codifica las proteínas ELRs (recombinámero de tipo elastina), en el vector de expresión pET7 RARE y pET7 TGF β, respectivamente. Estos vectores permiten una mayor transcripción del gen en la célula anfitriona. Obteniendo como genes finales el pET7 RARE C₃bot-Pentasilk y el pET7 TGF β CM₂-Pentasilk, preparados para su producción, purificación y posterior caracterización. De esta manera se inserta un gen ELR junto a la secuencia TGF β obteniendo un ELR con capacidad antiinflamatoria, promoviendo una cicatrización temprana no inhibitoria.
4. Se han realizado pruebas de caracterización del polímero Pentasilk-CM₂-C₃bot, corroborando con ellas que el polímero obtenido en la bioproducción de forma experimental, presenta las características de interés que debe tener de forma teórica. Por lo que es un polímero apto para comenzar a observar *in vitro* su posible funcionalidad.

7. BIBLIOGRAFÍA.

1. Gómez-Márquez J. La Revolución de la Ingeniería Genética. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*. **2013**; 20: 13–21.
2. Higgins SJ, Hames BD. *Protein Expression-A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford, U.K; **1999**.
3. Lakowitz A, Godard T, Biedendieck R, Krull R.. Mini Review: Recombinant Production of Tailored Bio-pharmaceuticals in Different *Bacillus* Strains and Future Perspectives. *Eur J Pharmaceutical, Biopharm.* **2018**; 126: 27-39.
4. Ali MA, Shahzadi M, Zahoor A, Dababat AA, Toktay H, Bakhsh A et al. Resistance to Cereal Cyst Nematodes in Wheat and Barley: An Emphasis on Classical and Modern Approaches. *Int J Mol Science.* **2019**; 126: 2-39.
5. Lutolf MP, Hubbel JA. Synthetic Biomaterials as Instructive Extracellular Microenvironments for Morphogenesis in Tissue Engineering. Volume 23. *Nature Biotechnology*; **2005**.
6. Harden JL, Li H.. Editorial: Special Issue on Designer Protein Biomaterials. *ACS Biomaterials Science and Engineering.* **2017**; 3(5): 658–660.
7. Peppas NA, Langer R. New Challenges in Biomaterials. *Science.* **1994**; 263(5154): 1715-1720.
8. Langer R, Tirrell DA. Designing Materials for Biology and Medicine. *Nature.* **2004**;428: 487-492.
9. Wagner HJ, Sprenger A, Rebmann B, Weber W. Upgrading Biomaterials with Synthetic Biological Modules for Advanced Medical Applications. *Adv Drug Deliv Rev.* **2016**; 105: 77-95.
10. Peppas NA, Hilt JZ, Khademhosseini A, Langer R. Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular Principles to Bionanotechnology. *Advanced Materials.* **2006**; 18: 1345-1360.

11. Nagase K, Yamato M, Kanazawa H, Okano T. Poly(N-isopropylacrylamide)-Based Thermoresponsive Surfaces Provide New Types of Biomedical Applications. *Biomaterials*. **2018**; 153: 27-48.
12. Stephen TK, Jocelyn EK, Lewin B, Goldstein E. *Lewin`s genes X*. Jones and Bartlett: Boston; **2011**.
13. Sambrook J, Fristch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. **1989**.
14. Klein DW, Prescott LM, Harley JP. *Microbiology*. 4th ed. WCB/McGraw-Hill, Boston; **1999**.
15. Prince JT, Mcgrath KP, Digirolamo CM, Kaplan DL. Construction, Cloning and Expression of Synthetic Genes Encoding Spider Dragline Silk. *Biochemistry*. **1995**; 34: 10879-10885.
16. Won JI, Barrow AE. (2002). A New Cloning Method for the Preparation of Long Repetitive Polypeptides Without a Sequence Requirement. *Macromolecules*. **2002**; 35: 8281-8287.
17. Goeden-Wood NL, Conticello VP, Muller SJ, Keasling JD. Improved Assembly of Multimeric Genes for the Biosynthetic Production of Protein Polymers. *Biomacromolecules*. **2002**; 3: 874-879.
18. Mithieux SM, Weiss AS. Elastin. *Advances in Protein Chemistry*. **2005**; 70: 437-461.
19. Bochicchio B, Pepe A, Tamburro AM. (2008). Investigating by CD the Molecular Mechanism of Elasticity of Elastomeric Proteins. *Chirality*. **2008**; 20: 985–994.
20. Foster JA, Bruenger E, Rubin L, Imberman M, Kagan H, Mecham R et al. Circular Dichroism Studies of an Elastin Crosslinked Peptide. *Biopolymers*. **1976**; 15(5): 833-41.
21. Gray WR, Sandberg LB, Foster JA. Molecular Model for Elastin Structure and Function. *Nature*. **1973**; 246(5434): 461-466.

22. Urry D.W. Entropic Elastic Process in Protein Mechanism. 1. Elastic Estructure Due to an Inverse Temperature Transition and Elasticity Due to Internal Chain Dinamics. *Journal of Protein Chemistry*. **1988**; 7: 1-34.
23. Urry D.W, Parker T.M. Mechanics of Elastin: Molecular Mechanism of Biological Elasticity and its Relationship to Contraction. *J Muscles Res Cell Motil*. **2002**; 23(5-6): 543-559.
24. Urry DW. What Sustains Life? Consilient Mechanisms for Protein-Based Machines and Materials. Springer-Verlag, LLC, New York; **2006**.
25. Perticaroli S, Ehlers G, Jalarvo N, Katsaras J, Nickels JD. Elasticity and Inverse Temperature Transition in Elastin. *J Phys Chem Lett*. **2015**; 6(20): 4018-25. doi: 10.1021/acs.jpcllett.5b01890.
26. Urry DW. Molecular Machines- How Motion and Other Functions of Living Organism Can Result from Reversible Chemical-Changes. *Angewandte Chemie-International Edition in English*. **1993**; 32: 819-841.
27. Urry DW, Woods TC, Hayes LC, Xu J, McPherson DT, Iwana M et al. Elastic Protein-Based Biomaterials: Elements of Basic Science, Controlled Release and Biocompatibility. *Biomaterials Handbook-Advanced Applications of Basic Sciences and Bioengineering*; **2003**.
28. Ibáñez-Fonseca A, Ramos TL, González de Torre I, Sánchez-Abarca LI, Muntión S, Arias FJ et al. Biocompatibility of Two Model Elastin-Like Recombinamer-Based Hydrogels Formed Through Physical or Chemical Cross-Linking for Various Applications in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *J Tissue Eng Regen Med*. **2018**; 12(3): e1450-e1460. doi: 10.1002/term.2562.
29. Urry DW. Characterization of Soluble Peptides of Elastin by Physical Techniques. *Methods Enzymol*. **1982**; 82: 673-716.
30. Cipriani F, Bernhagen D, Garcia-Arévalo C, de Torre IG, Timmerman P, Rodriguez-Cabello JC. Bicyclic RGD Peptides with High Integrin $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_3\beta_1$ Affinity Promote

- Cell Adhesion on Elastin-Like Recombinamers. *Biomed.* **2019**. doi: 10.1088/1748-605X/aafd83.
- 31.** Castellanos MI, Zenses AS, Grau A, Rodríguez-Cabello JC, Gil FJ, Manero JM et al. Biofunctionalization or REDV Elastin-Like Recombinamers Improves Endothelialization on CoCr Alloy Surfaces For Cardiovascular Applications. *Colloids Surf B Biointerfaces.* **2015**; 127: 22-32.
 - 32.** Girotti A. Desarrollo de una plataforma biotecnológica para la obtención de polímeros recombinantes tipo elastina. PhD Thesis. **2008**.
 - 33.** Girotti A, Reguera J, Rodríguez-Cabello JC, Arias FJ, Alonso M, Testera AM. Design and Bioproduction of a Recombinant Multi(bio)functional Elastin-Like Protein Polymer Containing Cell Adhesion Sequences for Tissue Engineering Purposes. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine.* **2004**; 15(4): 479–484.
 - 34.** Bertrand J, Di Polo A, McKerracher L. Enhanced Survival and Regeneration of Antagonists. *Neurobiol.* **2007**; 25: 65–72.
 - 35.** Loske P, Boato F, Hendrix S, Piepgras J, Just I, Ahnert-Hilger G et al.. Minimal Essential Length of Clostridium Botulinum C3 Peptides to Enhance Neuronal Regenerative Growth and Connectivity in a Non-enzymatic Mode. *Journal of Neurochemistry.* **2012**; 120(6): 1084–1096.
 - 36.** Holtje M, Just I, Ahnert-Hilger G. Clostridial C3 Proteins: Recent Approaches to Improve Neuronal Growth and Regeneration. *Annals of Anatomy.* **2011**; 193: 314-320.
 - 37.** Vaz ER, Fujimura PT, Araujo GR, Silva CA, Silva RL, Cunha TM et al. A Short Peptide That Mimics the Binding Domain of TGF β 1 Presents Potent Anti-Inflammatory Activity. *PLoS One.* **2015**; 10(8): 1-20.
 - 38.** Ould-Yahoui A, Tremblay E, Sbai O, Ferhat L, Bernard A, Charrat E et al. A New Role for TIMP-1 in Modulating Neurite Outgrowth and Morphology of Cortical Neurons. *PLoS ONE.* **2009**; 4(12).

39. Zou Y. Diseño y síntesis de un nuevo biomaterial recombinante para uso en regeneración tisular neuronal. Trabajo fin de Master. **2017**.
40. Herrero M. Modificación de vectores plasmídicos y su aplicación en polímeros ELR para aplicaciones biomédica. Trabajo Fin de Master. **2016**.
41. Santiago-Medina M, Gregus KA, Nichol RH, O'Toole SM, Gomez TM. Regulation of ECM Degradation and Axon Guidance by Growth Cone Invasomes. *Development*. **2015**; 142(3): 486–496.
42. Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Variants of the Cell Recognition Site of Fibronectin that Retain Attachment-Promoting Activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **1984**; 81(19): 5985-5988.
43. Fernández-Colino A, Arias FJ, Alonso M, Rodríguez-Cabello JC. Self-organized ECM-mimetic Model Based on an Amphiphilic Multiblock Silk-Elastin-Like Corecombinamer with a Concomitant Dual Physical Gelation Process. *Biomacromolecules*. **2014**; 15(10): 3781–3793.
44. Rodríguez-Cabello JC, Girotti A, Ribeiro A, Arias FJ. Synthesis of Genetically Engineered Protein Polymers (Recombinamers) as an Example of Advanced Self-Assembled Smart Materials. *Methods in Molecular Biology (Clifton)*. **2012**; 811: 17–38.
45. Rodríguez-Cabello JC, Arias FJ, Girotti A, Alonso M. Elastin-Like Polypeptides in Drug Delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **2016**; 97: 85-100.
46. Santos M, Serrano S, Gonzalez J, Vallejo R, Girotti A, Cuadrado P, Arias FJ. Genetically Engineered Elastin-Based Biomaterials for Biomedical Applications. *Curr Med Chem*. **2018**; doi: 10.2174/0929867325666180508094637.
47. Arias FJ, Santos M, Fernández-Colino A, Pinedo G, Girotti A. Recent Contributions of Elastin-Like Recombinamers to Biomedicine and Nanotechnology. *Cur Top Med Chem*. **2014**; 14(6): 819-836.

8. ABREVIATURAS

- pb: Pares de bases.
- kpb: kilopares de bases.
- µg: Microgramo.
- µL: Microlitro.
- MW: Molecular Weight.
- C₃bot: C₃ transferasas de ribosilación de ADP.
- PCC: Penstasilk-CM₂-C₃bot.
- CCP: C₃bot-CM₂-Pentasilk.
- CCPC: C₃bot-CM₂-Pentasilk-CM₂-C₃bot.
- **Código de representación de los aminoácidos.**

Nombre	Código de 3 letras	Código de 1 letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido Aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Ácido glutámico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Valina	Val	V

- **Código de representación de las bases nitrogenadas**

Adenina	A
Guanina	G
Citosina	C
Timina	T
Uracilo	U