



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

**Desarrollo y caracterización de nuevos sistemas poliméricos para
aplicaciones biomédicas**

Autor: Elisa Beltrán Parra

Tutor/es: Dra. Alessandra Girotti

Dr. Francisco Javier Arias Vallejo

Dra. Raquel Muñoz Martínez

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo simboliza el final de un largo camino al cual no habría podido llegar sin el apoyo de aquellas personas que lo han hecho posible. Es por ello que quiero expresar aquí mis agradecimientos.

En primer lugar a mis tutores, Alessandra y Javier, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo y llevar a cabo este trabajo, por enseñarme y permitirme aprender tanto. A Raquel, por guiarme en su escritura.

A mis padres, mi pilar fundamental, sin cuyo esfuerzo y sacrificio no habría llegado hasta aquí. Por apoyarme y animarme a seguir adelante y no abandonar. A mi hermano y a Raquel por estar siempre y demostrarme tanto cariño.

A Ruth y Marina, por estar en cada alegría y sobre todo en cada caída, por ser un gran apoyo durante tantos años y demostrar lo que es la verdadera amistad.

A mis químicas, por compartir y vivir de principio a fin esta carrera, sin las cuales todos estos años no habrían sido lo mismo.

A mis compañeros de laboratorio por ayudarme y enseñarme tanto en este trabajo, y por hacer más fáciles y llevaderos todos estos meses.

En definitiva, gracias a todas y cada una de las personas que me han aportado durante todos estos años, que han creído en mí y han confiado en que lo lograría.

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	4
2.1. BIOMATERIALES	4
2.2. CLONACIÓN DE DNA.....	5
2.3. ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	8
2.4. ELASTINA.....	9
2.4.1. Polímeros tipo elastina (ELP)	11
2.4.2. Recombinámeros tipo elastina (ELR)	11
2.5. NEUROREGENERACIÓN O REGENERACIÓN NEURONAL	13
3. OBJETIVOS	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS	15
4.1. MATERIALES	15
4.1.1. Reactivos químicos	15
4.1.2. Soluciones tamponadas	15
4.1.3. Materiales biológicos	16
4.1.4. Proteínas	17
4.1.5. Vectores.....	18
4.1.6. Plásmidos empleados para la síntesis de genes.....	20
4.1.7. Kits de extracción y purificación de DNA	22
4.2. MÉTODOS	22
4.2.1. Electroforesis de DNA.	22
4.2.2. Determinación de la concentración y pureza de una muestra de DNA.....	25
4.2.3. Purificación de plásmidos.	25
4.2.4. Precipitación de DNA.	27
4.2.5. Digestión de DNA con enzimas de restricción.	27
4.2.6. Tratamiento de DNA con enzimas de defosforilación.	28
4.2.7. Reacción de ligación.	29
4.2.8. Transformación de cepas bacterianas.....	29
4.2.9. Bioproducción de polímeros recombinantes.	31
4.2.10. Purificación de polímeros recombinantes.	33
4.2.11. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.	34
4.2.12. Caracterización física de polímeros recombinantes.	35

5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
5.1.	CONSTRUCCIÓN DE GENES QUE CODIFICAN LOS POLÍMEROS.....	41
5.2.	SÍNTESIS DE GENES RECOMBINANTES	43
5.3.	BIOPRODUCCIÓN	55
5.4.	CARACTERIZACIÓN	60
5.4.1.	Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)	60
5.4.2.	Resonancia magnética nuclear (RMN)	61
5.4.3.	Espectroscopía de masas (MALDI-TOF)	62
5.4.4.	Medidas reológicas.....	63
6.	CONCLUSIONES	66
7.	BIBLIOGRAFÍA	67
8.	ABREVIATURAS.....	69

1. RESUMEN

Actualmente existe un gran interés en la creación y desarrollo de nuevos materiales poliméricos que repliquen o mejoren sus propiedades, favoreciendo su utilización en aplicaciones biomédicas. Entre los materiales poliméricos proteicos, los de tipo elastina centran nuestro interés, ya que este tipo de compuestos pueden ser empleados en un gran número de aplicaciones, como alternativa a materiales menos sofisticados o en aplicaciones específicas por su estructura y sus propiedades.

En este estudio se pretende sintetizar varios polímeros proteicos recombinantes basándose en la estructura de la elastina natural, haciendo uso de las técnicas de ingeniería genética. Se emplea la bacteria *Escherichia coli* como huésped para la clonación y expresión de los genes de polímeros proteicos recombinantes que se desean sintetizar. La construcción del gen se realiza mediante la digestión, aislamiento y ligación de vectores de clonación con genes sintéticos. Obtenido el gen que codifica el polímero se lleva a cabo su bioproducción y purificación. Finalmente se caracteriza mediante diferentes técnicas químico-físicas: FT-IR (Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier), RMN (Resonancia Magnética Nuclear), espectroscopía de masas y medidas reológicas.

ABSTRACT

Currently there is a great interest in the creation and development of new polymeric materials that replicate or improve their properties, favoring their use in biomedical applications. Among the polymeric proteinaceous materials, the elastin-like centers our interest, since this type of compounds can be used in a large number of applications, as an alternative to less sophisticated materials or in specific applications due to their structure and properties.

This study aims to synthesize several recombinant protein polymers based on the structure of natural elastin, making use of genetic engineering techniques. The bacterium *Escherichia coli* is used as a host for the cloning and expression of the recombinant protein polymer genes that are desired to be synthesized. The construction of the gene is carried out through the digestion, isolation and ligation of cloning vectors with synthetic genes. Once it is obtained the gene that encodes the polymer, the bioproduction and purification is carried out.

Finally it is characterized by different chemical-physical techniques: FT-IR (Fourier Transform Infrared spectroscopy), NMR (Nuclear Magnetic Resonance), mass spectroscopy and rheological measurements.

2. INTRODUCCIÓN

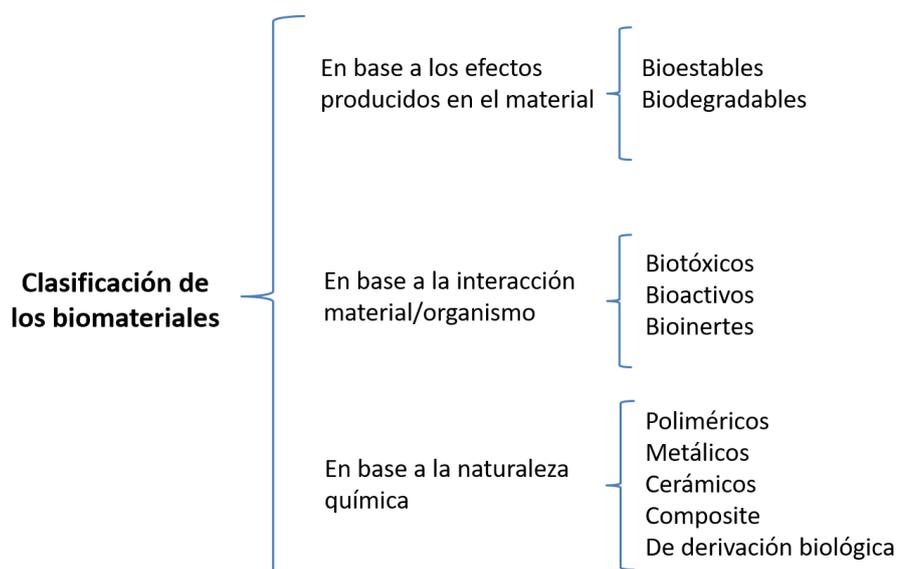
2.1. BIOMATERIALES

Los biomateriales se definen como sustancias naturales o sintéticas, diferentes de los alimentos o fármacos, empleados en sistemas terapéuticos o de diagnóstico; o como componentes de origen biológico que no se relacionan con sus aplicaciones.

A lo largo de la historia, los biomateriales han desempeñado un papel importante en encontrar un remedio al déficit de una función fisiológica y en la mejora de la salud. ¹ Estos materiales poseen la capacidad de sustituir total o parcialmente algunas funciones de un organismo vivo. Por ello, los biomateriales deben cumplir el requisito fundamental de la biocompatibilidad, es decir, no interactuar de forma perjudicial con el organismo. El grado de biocompatibilidad de un material es función de sus propiedades físicas, químicas, mecánicas y eléctricas. Además, depende del lugar de su implantación en el organismo y del tipo de aplicación. Otro requisito muy importante de un biomaterial es su duración, es decir, la capacidad de mantener sus prestaciones durante el tiempo necesario, ya sea un implante provisional o definitivo. ²

El gran desarrollo en el campo de los biomateriales y su efectividad hace que haya un creciente interés en su utilización debido principalmente a dos factores: la gran cantidad de población que está directamente afectada y que la esperanza de vida haya aumentado considerablemente.

Actualmente existen numerosas clasificaciones de los biomateriales. A continuación, se muestra una clasificación según varios aspectos importantes que deben tenerse en cuenta cuando se diseñan nuevos dispositivos. ²



En este trabajo se emplean biomateriales poliméricos. Se trata de polímeros producidos por el ser humano, desarrollados para aplicaciones biomédicas.

En la actualidad se emplean numerosos biomateriales poliméricos en dispositivos médicos.

Las principales ventajas que presentan estos polímeros respecto a otras clases de biomateriales son: su mayor biocompatibilidad, la posibilidad de modificar ampliamente su composición y propiedades mecánicas y la posibilidad de inmovilizar células o biomoléculas en su interior o en su superficie.³

Sin embargo, presentan una serie de desventajas como son la presencia de sustancias indeseadas que puedan ser liberadas en el organismo, la facilidad de absorber agua y biomoléculas desde el ambiente circundante, sus propiedades mecánicas y, en algunos casos, la dificultad de esterilización.³

2.2. CLONACIÓN DE DNA

La clonación de fragmentos de DNA es un paso previo necesario en la mayoría de los procesos en biología molecular que permite tener cantidades indefinidas de éste a partir de una sola molécula.

La posibilidad de clonar es debida a la capacidad que poseen plásmidos y fagos de continuar su desarrollo normal tras incorporar secuencias adicionales de DNA en su material genético. Un plásmido es un DNA circular extracromosómico y autorreplicante que existe en las bacterias, y un fago o bacteriófago es un virus bacteriano.

La inserción de secuencias foráneas genera un plásmido o fago quimérico o recombinante que se replica en bacterias como si fuese el plásmido o fago original. A los plásmidos o fagos utilizados para transportar DNA foráneo como parte de su genoma se les denomina vectores.

Los vectores de clonaje presentan un lugar específico en el cual se inserta el DNA foráneo sin interrumpir ninguna función esencial, denominado sitio de clonaje múltiple. El proceso mediante el cual se introduce un vector a una bacteria se denomina transformación.⁴

Pueden diferenciarse dos tipos de vectores, los de clonación que carecen de elementos promotores y reguladores y suelen estar presentes como múltiples copias dentro de la célula facilitando su aislamiento y purificación, y los plásmidos de expresión, con un

número bajo de copias por célula, que sí contienen elementos promotores y reguladores para incrementar la producción del producto recombinante.⁵

Un plásmido está dividido en distintas regiones:

- El punto ori, es el lugar de origen de la replicación del ADN. Si no existe esta zona no se replica el plásmido.
- Un promotor para el inicio de la transcripción.
- Un gen de resistencia específica a antibióticos. Cuando las bacterias ya no son sensibles a un antibiótico, siguen multiplicándose y dividiéndose en presencia de él. Esta presencia es esencial para seleccionar exclusivamente las colonias que hayan incorporado el vector y por tanto que han adquirido la resistencia al antibiótico.

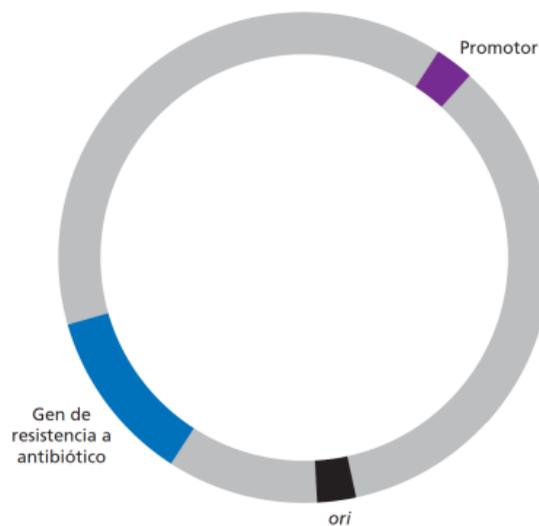


Figura 1: componentes básicos de un plásmido.

Una de las aplicaciones de la clonación es la obtención de genes específicos aislados directamente del genoma. La fragmentación del DNA genómico puede realizarse mediante cortes con enzimas de restricción, de tal forma que cada fragmento posea unos extremos bien definidos permitiendo su inserción en un vector.⁴ De esta forma combinando los fragmentos con DNA ligasa se obtiene una molécula de DNA recombinante. Este plásmido recombinante se introduce en bacterias. Se seleccionan las bacterias que contienen el plásmido, mediante el uso de antibióticos, y se cultivan. Al reproducirse replican el plásmido haciendo copias del DNA que contienen.⁶

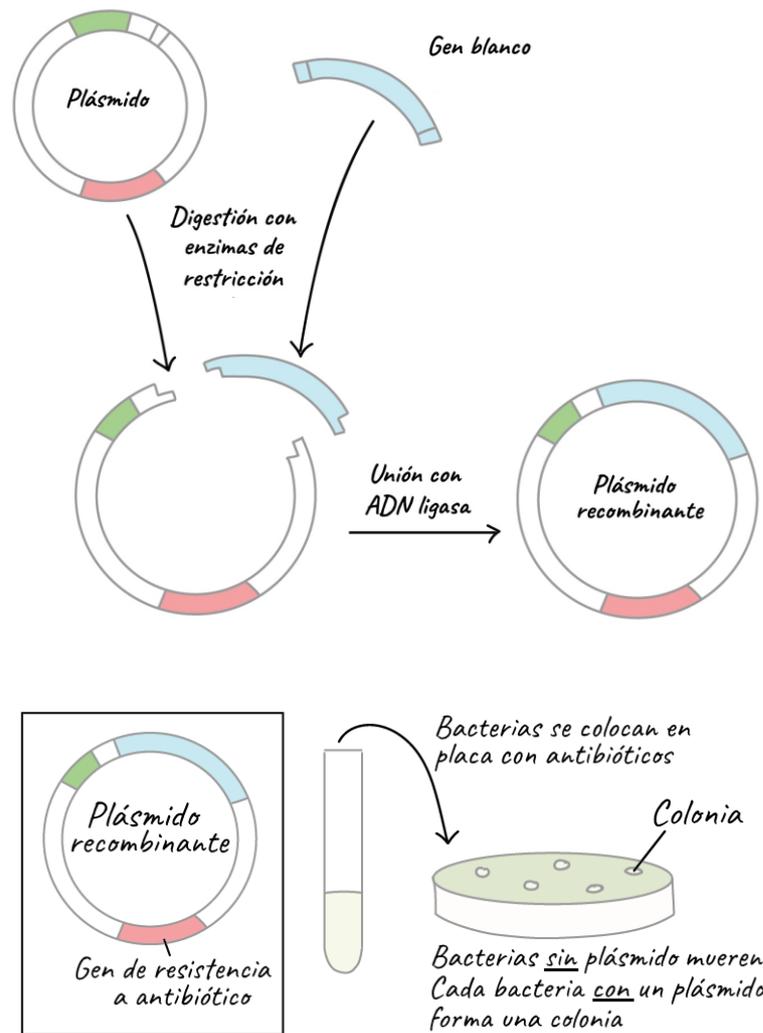


Figura 2: esquema de la clonación de DNA⁶.

El DNA plasmídico, producido en múltiples copias en bacterias, corresponde a la misma molécula que contiene el mismo número de pares de bases, aunque las moléculas de plásmido presentan dos o tres conformaciones, formas topológicamente diferentes. Las conformaciones se conocen como: lineal, circular relajada o estructura superenrollada. Estas presentan diferente movilidad electroforética, por lo que aparecen a diferentes alturas en un gel durante la electroforesis (Figura 3). En la forma lineal las hebras del DNA tienen dos extremos o terminales libres. Si estos extremos se unen dan lugar a una unidad circular cerrada. El DNA circular puede encontrarse en forma relajada, en la cual el círculo está desplegado sobre un único plano, o en forma superenrollada, en la cual el contorno del círculo gira sobre sí mismo adquiriendo profundidad y una forma más compacta.⁷

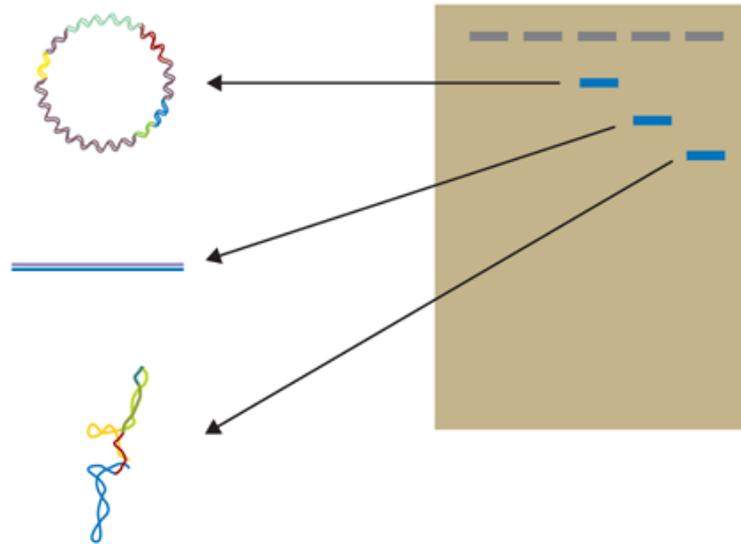


Figura 3: conformaciones del DNA con su correspondiente movilidad electroforética.

2.3. ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Las enzimas de restricción también conocidas como endonucleasas son enzimas que se encuentran en bacterias, que cortan el DNA y reconocen secuencias específicas en él, de entre 4 a 8 pares de bases, llamadas sitios de restricción. La secuencia que reconocen es, en la mayoría de los casos, una secuencia palindrómica, es decir, que se lee igual en ambas direcciones.

Cuando encuentra su secuencia blanco corta las dos cadenas de la molécula de DNA. Este corte puede ser en el propio sitio de reconocimiento o cerca. ⁸

Las enzimas de restricción al cortar el DNA pueden producir dos tipos de cortes:

- *Cohesivos o pegajosos*, que cortan de forma escalonada en dos puntos distintos, rompiendo la cadena en posiciones no simétricas y originando fragmentos con secuencias complementarias de una cadena.

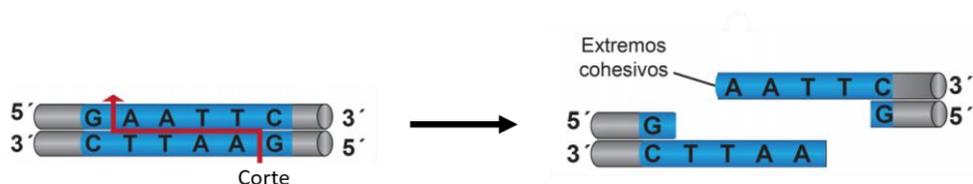


Figura 4: representación de un corte cohesivo con enzima de restricción (EcoRI).

- *Abruptos o romos*, que cortan en un solo punto, exactamente sobre los dos ejes de simetría.

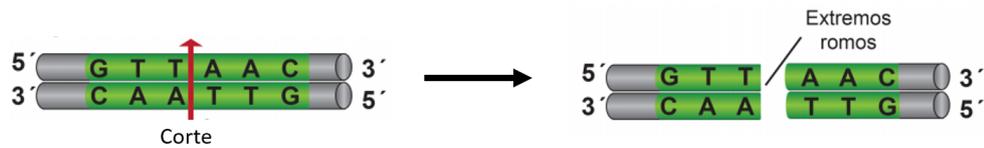


Figura 5: representación de un corte romo con enzima de restricción (EcoRI).

2.4. ELASTINA

La elastina es una proteína de gran importancia en la función estructural del tejido conjuntivo de vertebrados. Se encuentra en la matriz extracelular de arterias, ligamentos, pulmones y piel. Aparece en mayor proporción en los tejidos donde se requiere almacenar energía elástica y es importante para soportar esfuerzos. Tiene como propiedades proporcionar elasticidad, resistencia y recuperación en procesos de extensión y relajación.⁹ La elastina es una proteína fibrosa polimérica auto-ensamblable y muy insoluble.¹⁰ Sin embargo, su precursor, la tropoelastina, es soluble y está compuesta por dos dominios principales, un dominio reticular hidrófilo en α -hélice (responsable del entrecruzamiento), rico en residuos de K (Lisina) y A (Alanina), y un dominio elástico hidrófobo de conformación en forma de espiral β , rico en residuos de V (Valina), P (Prolina), G (Glicina). Las cadenas en α -hélice se unen entre ellas mediante numerosos enlaces covalentes intercatenarios mediados por lisinas, formando un retículo. Esta particular estructura permite a las fibras extenderse y volver sucesivamente a la posición de partida, es decir, tener un comportamiento típicamente elástico. El dominio elástico está compuesto por secuencias de aminoácidos, que se repiten a lo largo de su cadena, tales como VPGG, VPGVG, APGVG y VGVAPG. Entre estas secuencias, el pentapéptido VPGVG es el elemento más común con más de 50 repeticiones de este tipo que ocurren en una molécula de elastina.^{11, 12}

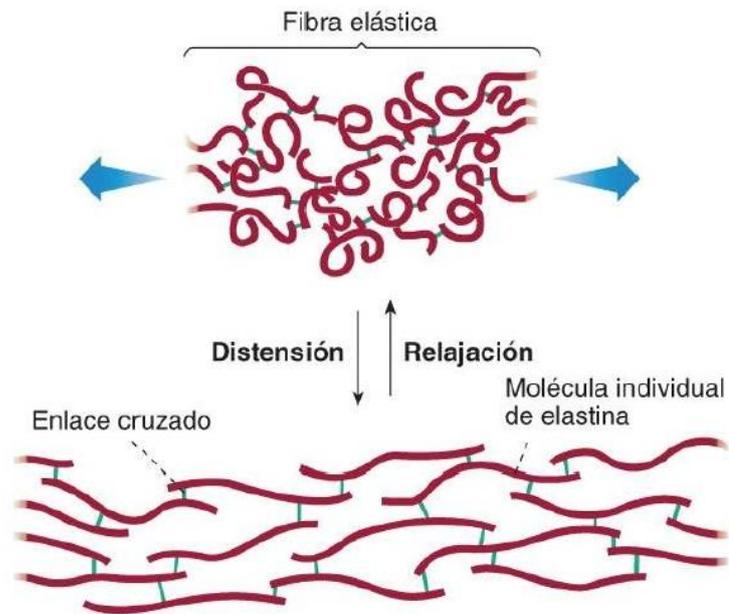


Figura 6: Comportamiento elástico de las moléculas de elastina.

En estado de reposo las hebras polipeptídicas de la elastina polimérica ricas en aminoácidos polares, se encuentran plegadas sobre sí mismas. Sin embargo, al tensionar la fibra elástica se induce un estiramiento de dicha zona 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, entrecruzamientos producidos al condensar cuatro residuos de lisina a través de sus cadenas laterales. 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 inicial (Figura 6).¹²

Cuando la elastina se encuentra en disolución acuosa, puede experimentar una transición desde un estado desordenado a un estado ordenado en el que las moléculas son capaces de agregarse, formando una fase densa y pegajosa.¹³ Esta transición desorden \rightarrow orden 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 denomina transición inversa, y a la temperatura a la cual ocurre, se la denomina

temperatura de transición (T_t).¹⁴ Esfuerzos investigadores importantes se han centrado en el estudio de la estructura de las fases ordenada y desordenada de la cadena polipeptídica, es decir, en la búsqueda de la relación estructura-propiedades, para comprender las causas que producen esta singular transición de fase.¹⁷

La variación de la T_t depende de muchos y distintos factores físicos relacionados con el ambiente en que se encuentra el polímero.¹⁵ Esto demuestra la posibilidad y la vía de diseño de polímeros proteicos, que realicen funciones específicas como cadenas aisladas o cuando se entrecruzan con matrices elásticas.¹⁶

Esta característica de la elastina, junto con su biocompatibilidad y sus propiedades mecánicas, han sido las responsables de que dicha proteína haya despertado un gran interés en el campo biomédico.

2.4.1. Polímeros tipo elastina (ELP)

Los polímeros tipo elastina (ELP, “Elastin Like Polymers”) son polipéptidos artificiales que replican los motivos repetidos presentes en la elastina natural. Los comúnmente más utilizados consisten en repeticiones del motivo (VPGXG)_n, donde el residuo “X” puede ser cualquier aminoácido excepto prolina debido a que su estructura cíclica impide la formación de horquillas β , y donde “n” representa el número de repeticiones del pentapéptido.

Debido a que la obtención de ELP por medios naturales o químicos es poco eficiente por su elevado coste, actualmente se producen biosintéticamente, dando lugar a los recombinámeros tipo elastina (ELR). Estos se caracterizan por su similitud con la proteína natural elastina, su obtención recombinante y su carácter polimérico.¹⁸

2.4.2. Recombinámeros tipo elastina (ELR)

Los recombinámeros tipo elastina (ELR “Elastin Like Recombinamers”) son polipéptidos artificiales cuya secuencia está basada en la propia elastina natural pero contienen secuencias añadidas que modifican sus características. Por lo tanto, los ELR mantienen las propiedades inherentes de la elastina además de las propiedades específicas proporcionadas por un diseño particular.

La similitud a nivel de secuencia de aminoácidos entre la elastina y los ELR se traduce en una similitud en otra serie de propiedades, como las propiedades mecánicas, la biocompatibilidad, la naturaleza termosensible y el comportamiento autoensamblable.

La elastina y, consecuentemente, los ELR, sufren una transición molecular reversible entre dos estados conformacionales en respuesta a cambios en la temperatura. En una solución acuosa, por debajo de la T_t , el polímero permanece disuelto e hidratado mediante hidratación hidrófoba. Esta hidratación se caracteriza por la existencia de estructuras tipo clatrato rodeando los residuos apolares del polímero. Sin embargo, por encima de la T_t , las moléculas de agua colocadas alrededor de los restos apolares pierden dicho orden por la agitación térmica: el estado estructurado del agua formando los clatratos deja de ser posible y la cadena polipeptídica se pliega hidrofóticamente formando una fase separada, en la que el polímero adopta una estructura regular llamada espiral β , constituida básicamente por una sucesión de horquillas β (Figura 7).

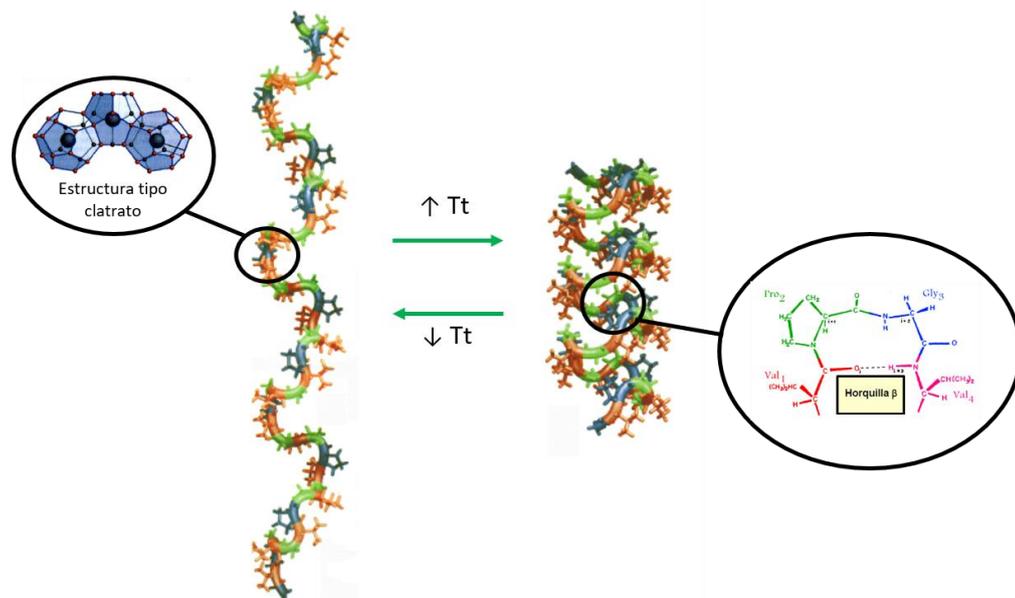


Figura 7: Estructura del polímero tipo elastina (ELR) por encima y por debajo de la T_t .

Es un hecho destacable que los ELR sean capaces de alcanzar estructuras más ordenadas cuando se aumenta la temperatura, ya que en la mayoría de las proteínas un aumento de la temperatura provoca desplegamiento y desnaturalización. Gracias a esta propiedad, los ELR han sido calificados como polímeros inteligentes, ya que son capaces de percibir el microambiente y sufrir cambios en respuesta a él.

El grado de conocimiento alcanzado en relación a la estructura y función de estos materiales, así como su biocompatibilidad, su comportamiento mecánico-elástico y

termosensible han convertido a los ELR en el punto de mira de muchas investigaciones científicas y como consecuencia de ello ha surgido un amplio número de aplicaciones biomédicas y biotecnológicas.¹⁸

2.5. NEUROREGENERACIÓN O REGENERACIÓN NEURONAL

Las células nerviosas o neuronas son el componente fundamental del sistema nervioso. Tienen la capacidad de conducir impulsos nerviosos, así como de transmitir información a otras neuronas.¹⁹

La neuroregeneración es la regeneración o la reparación de neuronas lesionadas, tejidos nerviosos o células. Puede incluir la generación de: nuevas neuronas, células gliales, axones, mielina y sinapsis.²⁰

Hay que diferenciar la regeneración en el SNC (Sistema Nervioso Central), que es prácticamente nula, de la regeneración en el SNP (Sistema Nervioso Periférico). En este último tiene lugar una importante actividad de regeneración neuronal. Se trata de un proceso dirigido por factores quimiotácticos secretados por las células de Schwann. Estas células promueven la regeneración del SNP y producen factores neurotróficos, que estimulan el crecimiento de las neuronas, y moléculas de adhesión celular, que marcan el camino por el que deben crecer los axones.¹⁹

Las lesiones del nervio periférico son frecuentes y deterioran mucho la calidad de vida de la persona afectada. En Europa, su incidencia es de cientos de miles de casos por año, siendo las causas más comunes los accidentes de tráfico, los desgarros con objetos cortantes y punzantes y las fracturas de huesos largos. A pesar de los avances alcanzados en las técnicas quirúrgicas, es muy difícil recuperar las funciones motoras y sensoriales, por lo que deben mejorarse los tratamientos regenerativos.²¹

La complejidad del sistema nervioso periférico y sus mecanismos de regeneración siguen siendo grandes enigmas para la ciencia. Sin embargo, la apuesta por el desarrollo y la investigación aplicada a la medicina regenerativa está permitiendo avances significativos en el diseño de biomateriales y de tecnologías de fabricación de última generación que sean capaces de restaurar el funcionamiento de nervios y neuronas cuando se producen lesiones.²²

3. OBJETIVOS

Como consecuencia de las propiedades de los ELR, cabe plantearse el diseño y la síntesis de nuevos materiales proteicos de tipo elastina que tengan efecto en aplicaciones biomédicas. Estos nuevos ELRs favorecen la regeneración post traumáticas proporcionando soporte estructural y determinando un efecto anti-inflamatorio y regenerador. Por ello se pretende sintetizar varios polímeros proteicos recombinantes a partir de un plásmido modificado genéticamente mediante la inclusión de una cola de 6 Histidinas que interaccionan con anticuerpos específicos, permitiendo un análisis histológico. Esta secuencia de aminoácidos añadida permite la identificación del biomaterial en tejidos huéspedes y la valoración de la interacción y la evolución *in situ*.

La síntesis y la producción de estos biomateriales se lleva a cabo de manera biotecnológica en la bacteria *Escherichia coli*.

Para ello el plan de estudio de este trabajo es el siguiente:

1. Utilizar las herramientas de la biología molecular para sintetizar tres genes que codifiquen polímeros de tipo elastina, con aplicaciones terapéuticas en biomedicina, mediante la inserción de diferentes bloques génicos combinados (Pentasilk, CM₂, C₃Bot) en un vector plasmídico de clonación pDrive All modificado con 6 His.
2. Bioproducir y purificar el polímero CM₂-Pentasilk TGF β , sintetizado en estudios anteriores.
3. Caracterizar el polímero producido, CM₂-Pentasilk TGF β , mediante diferentes técnicas químico-físicas: SDS-PAGE, FT-IR, RMN, espectroscopía de masas y medidas reológicas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES

4.1.1. Reactivos químicos

Todos los reactivos empleados en este trabajo se enumeran a continuación, junto con sus empresas proveedoras:

- Acrilamida (Amresco)
- Agarosa Seakem (Cambrex)
- Ampicilina (Apollo Scientific)
- Etanol (Merck)
- Glucosa (Sigma Aldrich)
- Kanamicina (Apollo Scientific)
- Dodecilsulfato sódico (SDS) (Merck)
- Tetra metilen diamin (TEMED) (Sigma Aldrich)
- Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) (Sigma Aldrich)
- Persulfato amónico (Sigma Aldrich)
- Glicerol (Merck)
- Azul de bromofenol
- Ácido etilendieaminotetraacético (EDTA) (Sigma Aldrich)
- DNA Marker: 1 kbPlus DNA Ladder (Invitrogen)
- Simply Safe (EURX)
- Fluoruro de fenilsulfonilmetano (PMSF)
- Dimetilsulfóxido (DMSO)

4.1.2. Soluciones tamponadas

- PBS: Tampón fosfato 5 mM, pH= 7,4, NaCl 140 mM.
- TAE (1x, 50x): Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH= 8.
- DNA Loading Buffer 5x: 30% glicerol, 0,1% SDS, 0,05% azul de bromofenol, 50 mM Tris pH=8, 0,5 mM EDTA).
- Tampón de sonicación: Tris-base 20 mM, EDTA 1 mM pH=8, PMSF 1 mM.

Las disoluciones empleadas se preparan utilizando agua desionizada tipo ultrapura (MilliQ).

El material de laboratorio empleado se adquiere estéril o se esteriliza en autoclave a 121°C y 1 atmósfera durante 20 minutos.

4.1.3. Materiales biológicos

4.1.3.1. Cepas bacterianas

Las cepas de la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) utilizadas en este trabajo como clonadora y productora del plásmido recombinante son las siguientes:

- XL1- Blue SUBCLONING GRADE (Stratagene). Eficiencia: $\geq 1.0 \times 10^6$ cfu/ μ g pUC 18 DNA.
- XL1- Blue COMPETENT GRADE (Stratagene). Eficiencia: $\geq 1.0 \times 10^8$ cfu/ μ g pUC 18 DNA.
- NZY5 α COMPETENT GRADE (nzytech). Eficiencia: $> 1.0 \times 10^9$ cfu/ μ g.

4.1.3.2. Medios de cultivo bacteriano

Los medios utilizados para el crecimiento y las transformaciones de las bacterias son los siguientes:

- **LB (Luria-Bertani):** medio utilizado principalmente para el crecimiento de bacterias. 25g/L (10g NaCl, 10g de bacto-triptona, 5g de extracto de levadura).
- **LB-agar:** medio utilizado para el recubrimiento de placas de cultivo bacteriano. Medio LB (25 g/L) con 15g de bacto-agar. Se esteriliza en autoclave (120°C, 2 horas). Añadir los correspondientes antibióticos en la concentración necesaria según su uso.
- **TB (Terrific Broth):** medio utilizado para la expresión y producción del polímero. 55,8 g/L (8 mL/L de glicerol).
- **SOC (Super Optimal Catabolite repression):** medio utilizado para llevar a cabo transformaciones bacterianas.
- **TSS (solución de transformación y almacenamiento):** LB suplementado con 10% (p/v) de PEG Mr= 3350,5% (v/v) de DMSO y 50 mM de Mg²⁺ a pH= 6,5.

Los medios tras su preparación se esterilizan en autoclave a 121°C y 1 atmósfera durante 20 minutos.

4.1.4. Proteínas

4.1.4.1. Enzimas de restricción

Las enzimas de restricción empleadas en este trabajo son:

- Fast Digest: *DpnI*, *EamI* (*EarI*), *EcoRI*, *HindIII*, *XbaI*, *XhoI* (Thermo Fisher). Utilizadas para diagnóstico del gen.
- *EamI* (*EarI*), *LguI* (*SapI*) (Fermentas). Empleadas para la clonación del gen.

Todas las enzimas se han utilizado con el tampón o buffer correspondiente y siguiendo el protocolo marcado por el fabricante.

Cada enzima presenta una secuencia de reconocimiento y de corte específicos.

Enzima de restricción	Sitio de reconocimiento
<i>EarI</i>	5' CTCTTCN NNN3' 3' GAGAAGNNNN 5'
<i>SapI</i>	5' GCTCTTCN NNN3' 3' CGAGAAGNNNN 5'
<i>EcoRI</i>	5' G AATTC3' 3' CTTAA G5'
<i>DpNI</i>	5' GA TC3' 3' CT AG5'
<i>XhoI</i>	5' C TCGAG3' 3' GAGCT C5'
<i>XbaI</i>	5' T CTAGA3' 3' AGATC T5'
<i>HindIII</i>	5' A AGCTT3' 3' TTCGA A5'

Tabla 1: Enzimas de restricción con sus correspondientes sitios de reconocimiento.

4.1.4.2. Otras enzimas

Se han utilizado las siguientes enzimas:

- FastAP (Thermosensitive Alkaline Phosphatase) (Thermo Fisher): enzima del grupo de las esterasas, cataliza la eliminación de grupos fosfatos de varios tipos de moléculas como nucleótidos y proteínas.
- SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) (Thermo Fisher): actúa de forma similar al FastAP.
- T4 DNA Ligasa (Thermo Fisher): enzima de unión de polinucleótidos. Cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre el grupo 3'-hidroxilo extremo de una de las cadenas de ADN y el grupo 5'-difosfato del extremo de la otra cadena de ADN.

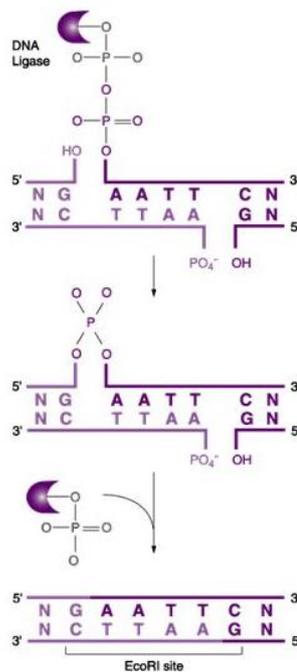


Figura 8: reacción de ligación con enzima T4 DNA ligasa.

4.1.5. Vectores

❖ **Vector de clonación:** utilizado para la clonación de los distintos fragmentos de DNA.

El vector utilizado en este trabajo para la clonación de fragmentos de DNA es un pDrive All modificado por A. Ribeiro en este laboratorio a partir del vector pDrive de Qiagen.²³

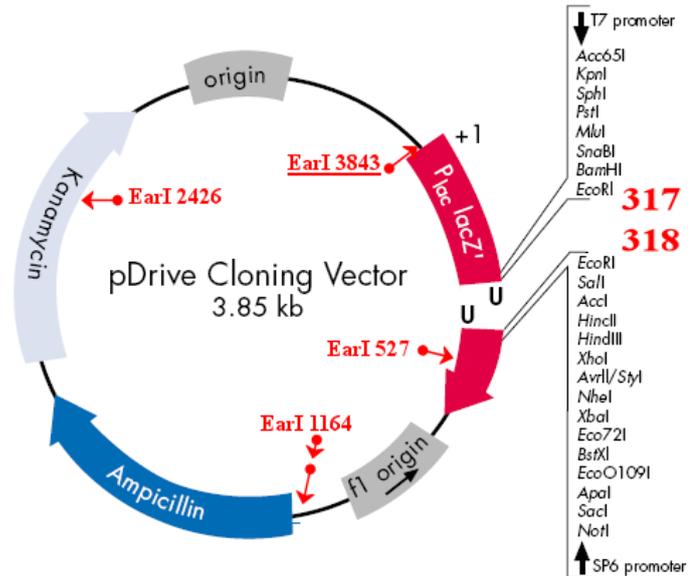


Figura 9: Representación de un vector de clonación pDrive modificado.

❖ **Vector de expresión:** utilizado para la expresión de los polímeros recombinantes.

Se emplea el vector pET7, construido previamente en este mismo laboratorio a partir del vector pET-25b (+) de Novagen, por la Dr. A. Girotti.²

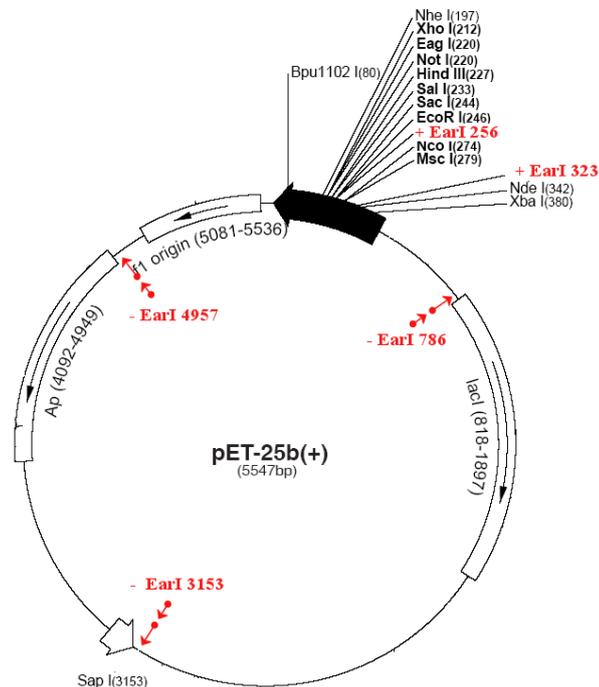


Figura 10: Representación de un vector de expresión de pET7 derivado del pET-25b (+). Se indica la posición, en pares de bases (pb), de los sitios de reconocimiento de la endonucleasa *EarI*, eliminados (- *EarI*) o añadidos (+ *EarI*).

4.1.6. Plásmidos empleados para la síntesis de genes.

Previamente es necesario conocer los códigos utilizados de representación de los aminoácidos que forman las secuencias:

A: Alanina	E: Ácido glutámico	Q: Glutamina
C: Cisteína	I: Isoleucina	L: Leucina
G: Glicina	R: Arginina	K: Lisina
T: Treonina	S: Serina	Y: Tirosina
V: Valina	M: Metionina	H: Histidina
P: Prolina	W: Triptófano	D: Ácido aspártico
F: Fenilalanina		

Para la construcción de los genes que codifican los polímeros se han utilizado genes obtenidos anteriormente contenidos en plásmidos. Se han empleado cuatro plásmidos diferentes para llevar a cabo las distintas clonaciones y sintetizar los genes deseados. Estos plásmidos son los siguientes:

❖ pDA His6 Tag:

Presenta un fragmento de 6 Histidinas, flanqueado por péptidos espaciadores ricos en glicina, que actúan como detectores del hidrogel y contiene 51 pares de bases (His6Tag). El pDA11 mutado contiene 3937 pb, por tanto el plásmido entero son 3988pb. Su secuencia es la siguiente, observándose en amarillo la secuencia de las 6 Histidinas (His 6):

```

M I T P S S N T T H Y R E S S V P R M L Q T R Y V S D
1041 TGATTACGCCAAGCTCTAATACGACTCACTATAGGGAAAGCTCGGTACCACGCATGCTGCAGACGCGTTACGTATCGGAT 1120
1041 ACTAATGCGGTTTCGAGATTATGCTGAGTGATATCCCTTTTCGAGCCATGGTTCGCTACGACGCTCTGCGCAATGCATAGCCTA 1120

P E F V I H C R R R L K A A K G D R S S V G G G V G H
1121 CCAGAATTTCGTGATTCACTGTAGGAGAAGACTGAAGGCAGCGAAAGGGGACCGCTCTTTCAGTAGGCGGTGGTGTCCGGTCA 1200
1121 GGTCTTAAGCACTAAGTGACATCCTCTTCTGACTTCCGTCGCTTTCCCTGGCGAGAAGTCATCCGCCACCACAGCCAGT 1200
                                     EarI

H H H H H G G G G G V R R V R * S P A V P G G N L N
1201 TCATCACCATCATCATGGTGGCGGTGGCGCGTAAGAAGAGTCCGCTAAAGTCCTGCCGTTCCCGGGGGTAACTCTGAATT 1280
1201 AGTAGTGGTAGTAGTACCACCGCCACCGCCGATTTCTCAGGCGATTTTCAGGACGGCAAGGGCCCCCATAGACTTAA 1280
                                     EarI

S S T S F S S L G * L * T T R G G P S P P
1281 CGTCGACAAGCTTCTCGAGCCTAGGCTAGCTCTAGACCACACGTGGGGGCCGAGCCCCCCC 1342
1281 GCAGTGTTTCGAAGAGCTCGGATCCGATCGAGATCTGGTGTGCACCCCGGGCTCGGGGGG 1342

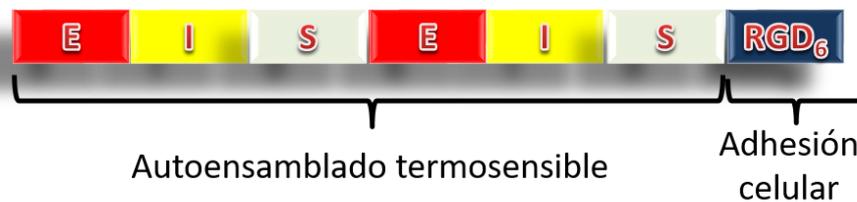
```

His 6 = VGGGVGHHHHHHGGGGGV

En este vector pDA His6 Tag serán introducidos por separado los insertos que se comentan a continuación.

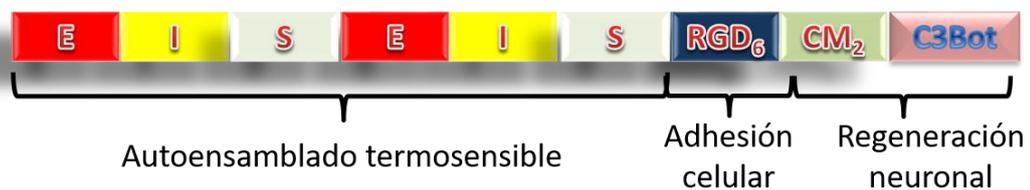
❖ pDA Pentasilk

El inserto Pentasilk contiene 4191 pb, siendo el plásmido completo 8128 pb. Consta de dos repeticiones del bloque EIS que forma el esqueleto del material proteico, se autoensambla y es sensible a la temperatura, y el RGD que es la parte bioactiva de la molécula que promueve la adhesión celular. Este fragmento se repite en los tres insertos.



❖ pDA Pentasilk-CM₂-C₃Bot

Este plásmido contiene el inserto Pentasilk-CM₂-C₃Bot que tiene 4440pb, siendo el tamaño del plásmido total de 8377pb. Este inserto está formado por una serie de bloques cada uno de los cuales presenta una función y unas características específicas.

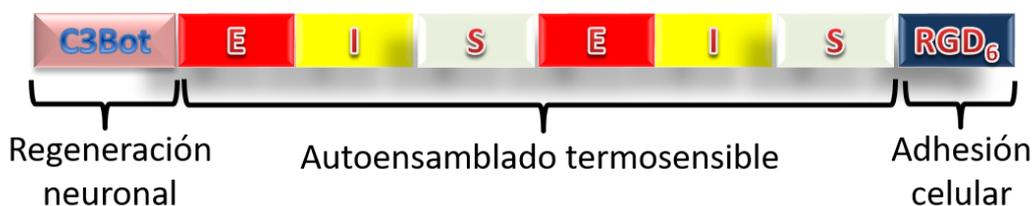


Cada uno de estos bloques tiene una secuencia de aminoácidos determinada, de tal forma que uniendo todos ellos se obtiene la secuencia global del inserto.

	=	[(VPGVG) ₂ VPGEG (VPGVG) ₂] ₁₀
	=	(VGIPG) ₆₀
	=	Silk-like peptide = [V(GAGAGS) ₅ G] ₂
	=	[(VPGIG) ₅ AVTGRGDSPASS] ₆
	=	VAKGSKAGYIDPISAFAGQLEMILLPRHST
	=	VGGGGGPMGSPGPWGGGGG VGGGGQPQGLAKGGGGG VGGGGGPQGIWQGGGGG

❖ pDA C3Bot-Pentasilk

Este plásmido contiene el inserto C3Bot-Pentasilk que tiene 4263 pb y el plásmido entero 8200 pb.



4.1.7. Kits de extracción y purificación de DNA

Se utilizan dos kits para la purificación de DNA plasmídico a partir de cultivos de *E.coli*:

- *NucleoSpin Plasmid/Plasmid (NoLid)* (Macherey-Nagel), para pequeñas cantidades de plásmido.

- *Quantum Prep Plasmid Midiprep Kit* (Bio-Rad), para grandes cantidades de plásmido.

Para la extracción de DNA a partir de un gel de agarosa se utiliza el kit:

- *PureLink Quick Gel Extraction Kit* (Invitrogen, Life Technologies).

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Electroforesis de DNA.

❖ Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

La electroforesis de DNA en geles de agarosa es una técnica que permite separar y comprobar el aspecto y tamaño de los fragmentos de DNA, ya sea de una purificación de un plásmido, de los fragmentos resultantes de una digestión con enzimas de restricción, o bien de las amplificaciones obtenidas en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La agarosa es un polisacárido formado por galactosas alfa y beta que se extrae de las algas. Se disuelve en caliente (50-60°C) y al enfriar solidifica formando un gel, de alta porosidad.

Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas de DNA cargadas, en función de su tamaño y forma, que migran bajo la influencia de un campo eléctrico. Los fragmentos de DNA tienen carga negativa, por lo que se mueven hacia el

electrodo positivo. Los fragmentos pequeños atraviesan el gel más rápido que los grandes, lo que permite la separación.

Es importante la utilización de marcadores de tamaño conocido que permiten extrapolar los tamaños aproximados en pb de las muestras de DNA problema.

Los geles de agarosa permiten la separación de fragmentos de DNA comprendidos entre 100 y 23000 pb en función de la concentración de agarosa empleada, como se muestra en la siguiente tabla:

Tamaño de los fragmentos en pares de bases (pb)	% Final de agarosa 1x TAE Buffer
1000 – 23000	0,60
8000 – 10000	0,80
400 – 8000	1,00
300 – 7000	1,20
200 – 4000	1,50
100 – 3000	2,00

Tabla 2: resolución óptima para DNA lineal a diferentes concentraciones (%) de Agarosa Seakem.

Dependiendo del tamaño de los fragmentos de DNA de la muestra y el tipo de gel, analítico o preparativo, se realizan geles a distintas concentraciones de agarosa en tampón TAE 1x.

Los geles analíticos se emplean para el diagnóstico del estado de una molécula de DNA y son poco voluminosos. Los geles preparativos se utilizan para recuperar el DNA tras un proceso de digestión enzimática para una manipulación posterior. A diferencia de los analíticos, son geles de mayor volumen o grosor y deben realizarse con especial cuidado y con todo el material limpio para que no haya ningún tipo de contaminación.

Los geles de agarosa se preparan añadiendo en un matraz Erlenmeyer la cantidad de agarosa y el volumen de tampón TAE1x necesario, según la concentración, el tamaño y el tipo de gel que se desea preparar. Se pesa el Erlenmeyer con la disolución de agarosa y tampón y se tara a cero. Se funde en el microondas hasta que no queden restos sólidos de

agarosa. Una vez fundida, se vuelve a pesar el Erlenmeyer y se recupera el peso inicial añadiendo agua MilliQ o ultrapura. De esta manera no se modifica la concentración y el gel es homogéneo y uniforme. Se deja enfriar un poco y se vierte en el formador del gel que contiene el peine que forma los pocillos, en los cuales se van a colocar las muestras de DNA.

Antes de cargar las muestras de DNA en los pocillos se les añade 0,20 volúmenes de tampón de carga Loading Buffer 5x, a excepción de las digestiones con enzimas de restricción Fast Digest cuyo buffer ya está incluido en el procedimiento de la digestión. A continuación, los geles se someten a un voltaje fijo comprendido entre 2 y 7 V/cm que distan los electrodos. Según el tipo de gel (analítico o preparativo) las condiciones serán distintas.

Finalizado el tiempo de electroforesis, se tiñe el gel en una solución de Simply Safe en TAE 1x, y se visualizan las bandas de DNA mediante un transiluminador de luz UV Gel Doc™ EZ Imager. Se emplea como patrón de tamaño el marcador 1 kbPlus DNA Ladder.

❖ Evaluación de los fragmentos de DNA.

La evaluación del tamaño aproximado de los fragmentos de DNA en pb se realiza por comparación con el patrón de referencia, 1 kbPlus DNA Ladder (Invitrogen), que presenta bandas de tamaño definido.

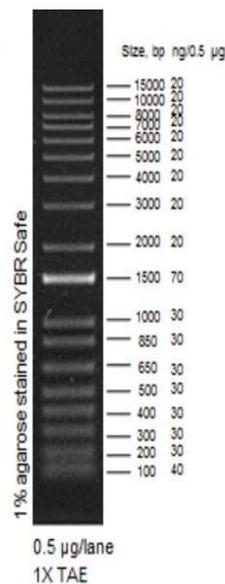


Figura 11: bandas del patrón de referencia 1 kbPlus DNA Ladder.

Invitrogen 1 Kb Plus DNA Ladder está diseñado para dimensionar y cuantificar de forma aproximada el DNA de doble cadena en el rango de 100 pb a 15000 pb. El patrón consta de 18 fragmentos individuales de DNA purificados por cromatografía y tiene una banda de 1500 bp para una fácil orientación.

4.2.2. Determinación de la concentración y pureza de una muestra de DNA.

La concentración de DNA se determina tras su purificación mediante la utilización de un espectrofotómetro de micromuestra NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Se trata de un espectrómetro de UV- visible de espectro completo, que permite cuantificar y evaluar la pureza de ADN, ARN, proteínas, etc. Mide volúmenes de muestra tan pequeños como 0,5 μ L.

El grado de pureza de la muestra de DNA aislada se evalúa mediante los ratios de absorbancias (260/280 y 260/230). Un valor entre 1,8-2 para el rango 260/280 supone una pureza óptima de ácidos nucleicos.

4.2.3. Purificación de plásmidos.

Se han llevado a cabo diferentes formas de purificación de un plásmido:

❖ Purificación de ADN plasmídico de cepas bacterianas (*E.coli*):

Esta purificación puede llevarse a cabo mediante la utilización de dos kits mencionados anteriormente (punto 4.1.7). Así, el kit *NucleoSpin Plasmid/Plasmid (NoLid)*, para purificar pequeñas cantidades de plásmido y el *Quantum Prep Plasmid Midiprep Kit*, para grandes cantidades. Siguiendo en ambos casos los correspondientes protocolos establecidos por las casas comerciales, que se muestran a continuación:

- *NucleoSpin Plasmid/Plasmid (NoLid)*:

En primer lugar, se realiza una lisis celular añadiendo buffer A1 almacenado a 4°C, ya que contiene RNAsa, para que el RNA se degrade y que no se co-purifique. A continuación, se añade buffer A2, con el cual se realiza la lisis alcalina, revisándolo previamente ya que puede contener SDS (dodecilsulfato sódico) precipitado y debe ser disuelto para garantizar su efectividad.

Se añade buffer A3 que contiene ácido acético y neutraliza la reacción. Se transfiere la mezcla a una microcolumna de extracción, tal y como se observa en la figura 12, donde tras una centrifugación el DNA queda absorbido a la membrana contenida en la base de la microcolumna. Posteriormente se procede al lavado de la membrana con los correspondientes buffer de lavado (AW y A4). Finalmente, se lleva a cabo la elución del DNA purificado con buffer de elución AE y se determina su concentración.

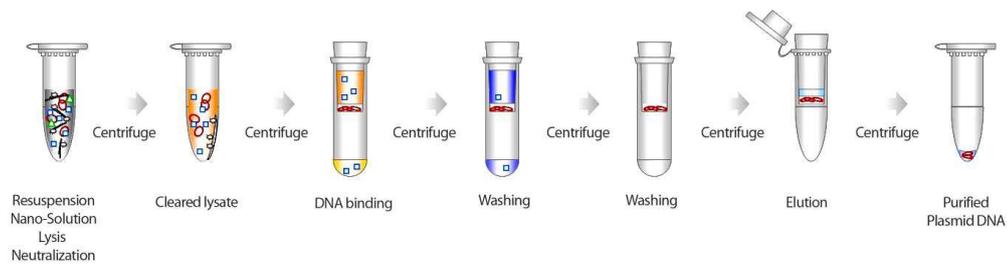


Figura 12: Esquema del proceso de purificación de ADN plasmídico.

- *Quantum Prep Plasmid Midiprep Kit:*

Se basa también en una lisis alcalina. Se comienza añadiendo en orden los reactivos de resuspensión, lisis y neutralización. A continuación, se añade al sobrenadante el Quantum Prep, una resina en solución. Se desecha el sobrenadante y se añade a la matriz el buffer de lavado (WB), que contiene etanol. Se transfiere la resuspensión a una columna de microcentrífuga y se lava de nuevo con WB. Se elimina cualquier residuo de WB y se transfiere la columna a un tubo de recolección y se eluye con agua MilliQ caliente. Se determina su concentración y se almacena a -20°C .

❖ **Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa:**

La extracción y purificación de fragmentos de DNA se lleva a cabo tras una electroforesis en gel de agarosa preparativo. La banda de DNA de interés se separa, visualiza y extrae a partir de un gel de agarosa de la concentración adecuada. Se corta con un bisturí el fragmento de agarosa que contiene la banda, procurando extraer la mínima cantidad posible de agarosa y se purifica mediante el sistema *PureLink Quick Gel Extraction Kit* (Invitrogen, Life Technologies), siguiendo el correspondiente protocolo.

En primer lugar para disolver el gel se añade Buffer L3 en una proporción 3:1 (por cada volumen de gel, 3 de buffer). Se incuba a 50°C para facilitar la disolución de la agarosa. Una vez disuelta la agarosa, se añade un volumen de isopropanol. La mezcla se transfiere

a una columna de extracción y se lava con buffer de lavado (W1) que contiene etanol. Se eliminan bien ambos alcoholes y se eluye la muestra en un tubo de recuperación con buffer de elución (E5) o con agua MilliQ.

Finalmente, se determina la concentración del DNA purificado. Se almacena a 4°C para uso inmediato o a -20°C para largo plazo.

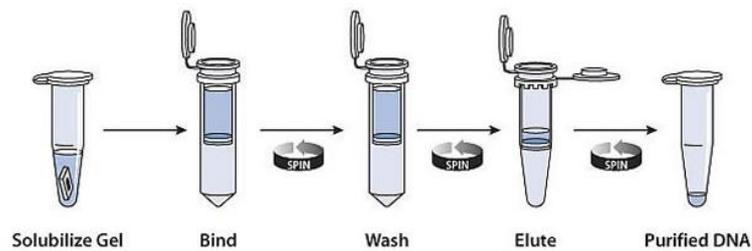


Figura 13: Esquema del proceso de purificación de ADN con PureLink Quick Gel Extraction Kit.

El kit de extracción de gel rápido PureLink no está diseñado para purificar ADN plasmídico superenrollado o ADN genómico de geles de agarosa. Solo los fragmentos de ADN lineales pueden purificarse a partir de geles con este kit.

4.2.4. Precipitación de DNA.

Para precipitar fragmentos de DNA se añade a la solución 0,1 vol. de acetato sódico 3M, pH=5,2 y 2,5 vol. de etanol 100%. Se enfría la mezcla a -20°C durante 2 horas y posteriormente se recupera el DNA centrifugando a 13800 xg durante 20 minutos a 4°C. Se decanta cuidadosamente el sobrenadante y se realizan dos lavados del precipitado con etanol al 70% (enfriado a -20°C) para eliminar las sales. Se vuelve a precipitar el DNA por centrifugación (13800 xg, 20 minutos a 4°C). Se retira el etanol sobrenadante con cuidado de no arrastrar DNA y se seca el precipitado a temperatura ambiente durante 15 minutos, para eliminar los restos de etanol. Una vez seco, se resuspende en agua MilliQ incubando 10 minutos a 70°C.

4.2.5. Digestión de DNA con enzimas de restricción.

Las reacciones de digestión de DNA con enzimas de restricción se llevan a cabo en las condiciones indicadas por la casa comercial que suministra la enzima (temperatura,

concentración, tiempo de reacción, tampón de reacción utilizado, variaciones de las condiciones en las dobles digestiones, etc).

El alcance de la digestión se controla mediante electroforesis de DNA en gel de agarosa. Se realizan dos tipos de digestiones con enzimas de restricción: diagnóstica y preparativa. La digestión diagnóstica se utiliza para comprobar el éxito de una clonación o sus etapas previas, mientras que la preparativa se usa para cortar una cadena de DNA por el sitio de interés para realizar posteriormente una clonación.

Para la digestión diagnóstica se han empleado las enzimas *Fast Digest EarI*, *EcoRI*, *DpNI*, *XhoI*, *XbaI* y *HindIII*. Para un volumen final de 5 μ L se añaden 100-200 ng de DNA (1 μ L), 0,5 μ L de buffer 10x de la enzima correspondiente (*Green Buffer Fast Digest*), 0,5 μ L de enzima y un volumen de agua MilliQ hasta llegar a un volumen total de 5 μ L. Se incuba a 37°C durante 15-20 minutos.

Para la digestión preparativa se emplean las enzimas *EarI* y *SapI*. La cantidad de DNA digerido ha sido variable en los distintos ensayos realizados (valores entre 1 y 10 μ g), así como las cantidades de enzima y buffer (Tango 10x) indicadas por la casa comercial. La incubación tiene lugar a 37°C durante 16-21 horas.

4.2.6. Tratamiento de DNA con enzimas de defosforilación.

La reacción de defosforilación se lleva a cabo 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 en las condiciones indicadas por la casa comercial que suministra la enzima (temperatura, tiempo de reacción, tampón utilizado, inactivación, etc).

La defosforilación completa del plásmido se obtiene utilizando consecutivamente dos enzimas fosfatasas distintas (FastAP y SAP). La primera se incuba durante 10-15 minutos a 37°C y se inactiva 5 minutos a 65°C. La segunda se incuba durante 1 hora a 37°C y se inactiva 15 minutos a 80°C. Es importante en este proceso no sobrepasar los tiempos de incubación.

El control de la defosforilación de las extremidades cohesivas se realiza mediante la transformación de bacterias competentes según el protocolo habitual, tras una reacción de ligación sin inserto.

4.2.7. Reacción de ligación.

Las ligaciones se han realizado en un volumen total entre 15-20 μL . Incluye una cierta cantidad del vector (50-200 ng), mezclado con el inserto en una proporción molar desde 1:1 hasta 5:1, junto con la enzima T4 DNA ligasa, suplementada con su buffer correspondiente (Buffer 10x T4 ligasa), añadidos según las indicaciones del protocolo. La reacción se incuba a 22°C durante 30-60 minutos, o bien, a 4°C durante 16-24 horas. No es necesaria la inactivación de la enzima.

El DNA resultante de la reacción de ligación se puede almacenar a -20°C hasta su uso para la transformación bacteriana.

4.2.8. Transformación de cepas bacterianas.

Se han utilizado tres tipos diferentes de cepas bacterianas de *E. coli*, cada una de ellas con una competencia y tratamiento específico (punto 4.1.3.1). Todas ellas se encuentran almacenadas a -80°C y son descongeladas en hielo en el momento de su uso, siendo una etapa crítica para su viabilidad.

La transformación de estas cepas bacterianas se lleva a cabo siguiendo el protocolo especificado por la casa comercial que las suministra.

❖ Transformación con XL1-Blue Subcloning Grade:

Estas bacterias son suministradas con una eficiencia de transformación de 10^6 transformantes por microgramo de DNA de plásmido. Son empleadas para realizar subclonaciones, es decir, para amplificar o expresar en otra cepa un plásmido entero.

Para la transformación, se emplean alícuotas de 10 μL (almacenadas a -80°C), que se descongelan en hielo. Una vez descongeladas se depositan en tubos de polipropileno (de 15 mL, especiales para transformaciones) previamente enfriados en hielo. Se agregan 0,5 μL de plásmido y se incuba la mezcla en hielo durante 20 minutos. A continuación, se somete la muestra a un choque térmico a 42°C durante 30 segundos, para permeabilizar la membrana celular de la bacteria y que se introduzca el DNA plasmídico en el interior de la célula. Tras el choque térmico, la muestra se atempera en hielo durante 2 minutos. Se añaden 180 μL de medio SOC (punto 4.1.3.2) y se incuba la mezcla a 37°C durante 30 minutos con una agitación de 225-250 rpm.

Finalmente, se siembran 50 y 100 μL de la solución en placas Petri de LB-agar con una concentración adecuada de los correspondientes antibióticos (Ampicilina y Kanamicina), cuya resistencia por parte de las bacterias se adquiere con la inserción del plásmido.

Las placas se incuban a 37°C durante toda la noche (16-21 horas). Se almacenan boca abajo para evitar que la condensación pueda contaminar las colonias y tapadas con papel de aluminio.

Crecidas las colonias se eligen aquellas que se encuentren lo más aisladas posibles sin que presenten satélites alrededor (pequeñas colonias bacterianas que se encuentran alrededor de la bacteria transformante y que pueden poseer una información genética diferente a la de interés).

Las colonias elegidas se inoculan en medio líquido para su crecimiento. Este puede ser a pequeña o grande escala.

Para el crecimiento a pequeña escala, se inocula cada colonia en un tubo Falcon de 50 mL con 5 mL de medio LB y 5 μL de los antibióticos necesarios (Ampicilina y Kanamicina). Los tubos se incuban a 37°C durante 16-21 horas con agitación (250 rpm).

Para una producción a gran escala, se inoculan las colonias en un matraz Erlenmeyer de 250 mL autoclavado con 40-50 mL de medio de cultivo LB con los antibióticos correspondientes.

Una vez producido el crecimiento bacteriano se lleva a cabo la purificación del DNA, tal y como se explicó anteriormente (punto 4.2.3).

❖ **Transformación con XL1-Blue Competen Grade:**

Este tipo de cepas son suministradas con una eficiencia de transformación de 10^8 transformantes por microgramo de DNA de plásmido. Son empleadas para realizar clonaciones.

El proceso de transformación es similar al descrito para la cepa anterior, con variación en los volúmenes añadidos y tiempos de incubación.

En este caso se emplean alícuotas de 40 μL de células, descongeladas en hielo, a las cuales se ha añadido la cantidad adecuada de β -mercaptoetanol. Se agregan 4 μL del DNA resultante de la reacción de ligación y se incuba la mezcla en hielo durante 30 minutos. A continuación, se somete la muestra a un choque térmico a 42°C durante 45 segundos y se

vuelve a introducir en hielo durante 2 minutos. Se añaden 360 μL de medio SOC y se incuba la mezcla a 37°C durante 1 hora con agitación a 225-250 rpm.

Finalmente, se siembran 80 y 320 μL de la transformación bacteriana en placas Petri de LB-agar con una concentración adecuada de los antibióticos apropiados (Ampicilina y Kanamicina) y se incuban a 37°C durante toda la noche (16-21 horas).

❖ **Transformación con NZY5 α Competent Grade:**

Este tipo de cepas son las que presentan mayor eficiencia de transformación de las tres utilizadas, siendo de 10⁹ transformantes por microgramo de DNA de plásmido. Se han empleado para clonaciones.

El procedimiento es similar al de la cepa anterior con alguna ligera variación.

Se emplean alícuotas de 50 μL de células junto con 5 μL del DNA resultante de la reacción de ligación. Se incuba la mezcla en hielo 30 minutos y se somete al choque térmico 42°C durante 40 segundos. Se incuba en hielo 2 minutos y se añaden 450 μL de medio SOC. Se incuba la mezcla a 37°C durante 1 hora con agitación a 225 rpm.

Por último, se siembran 100-250 μL de la transformación en placas de LB-agar con los antibióticos apropiados (Ampicilina y Kanamicina) y se incuban a 37°C durante toda la noche (16-21 horas).

4.2.9. Bioproducción de polímeros recombinantes.

Para la producción de un polímero recombinante tipo elastina (ELR) en primer lugar debe realizarse la transformación bacteriana del plásmido de interés con un vector de expresión con una cepa BLR de *E.coli*. Estas bacterias son las más utilizadas en expresión de proteínas de tipo elastina.

Las bacterias transformadas se siembran en una placa de LB-agar, medio que favorece el crecimiento bacteriano, con los antibióticos adecuados y glucosa al 1%, que actúa como inhibidor de la expresión. Se incuban durante toda la noche (16-21 horas) a 37°C y 250 rpm, produciéndose así el crecimiento de colonias. Se seleccionan 7-8 colonias y se inoculan de forma separada, en medio líquido en Falcon de 50 mL, con 5 mL de medio TB y 5 μL de antibiótico (Ampicilina). Se incuban a 37°C durante 12-16 horas con agitación a 250 rpm. Posteriormente, el extracto proteico crudo de las colonias seleccionadas se someten a una electroforesis de proteínas en un gel de acrilamida, con el

fin de analizar su crecimiento celular y seleccionar aquella colonia que presenta mayor producción de proteína recombinante.

Una vez seleccionada la colonia más productora, se prepara el preinóculo. Para ello se siembra en un Falcon (50mL) con 5 mL de medio LB (con antibiótico Ampicilina) y glucosa al 1% (250 μ L) y se incuba durante toda la noche a 37°C y 250 rpm. A continuación, se inoculan 100 μ L del cultivo crecido en 30 mL de LB (con Ampicilina) y glucosa al 1% (1,5 mL), en un Erlenmeyer de 250 mL. El volumen de medio en los Erlenmeyers no debe superar el 20-25% de su capacidad para favorecer una buena oxigenación del cultivo. Se incuba durante 5-6 horas a 37°C y 250 rpm. Obtenido el segundo inóculo, se transfieren 15 mL del mismo a dos Erlenmeyers de 2 litros, con 500 mL de medio LBA y 1% de glucosa cada uno, y se incuban durante 2-3 horas a 37°C y 250 rpm.

La producción a gran escala se realiza en un fermentador, es similar a la realizada en Flask pero con mayor control de los parámetros. Para ello se preparan 14L de medio TB, con una concentración de 55,8 g/L, con 8% (v/v) de glicerol y 0,1% (v/v) de antiespumante.

A continuación, se procede a la esterilización del mismo por medio de autoclave. Después, se añaden 7 mL de antibiótico (Ampicilina), se conecta el fermentador siguiendo el correspondiente protocolo y se estabilizan los parámetros (pH (neutro), T^a (37°C), O₂ (100%), agitación (500rpm)). Finalmente, se introduce el inóculo en el fermentador y se deja crecer toda la noche (mínimo 16 horas).

Pasado ese tiempo, se toman muestras del fermentador en tres periodos de media hora, se realiza una dilución 1:20 (en MilliQ) y se mide su absorbancia mediante un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 600 nm. También es necesario medir la absorbancia del inóculo y del control (dilución 1:10). En todas ellas se realiza primero la medida de un blanco para ajustar el espectrofotómetro a cero y después la muestra.

Este método permite estudiar y comprobar el crecimiento bacteriano a tiempo real. Si las tres medidas de absorbancia se mantienen constantes o se observa decrecimiento indica que la producción ha llegado a la fase de muerte celular. En ese momento se da por finalizada la fermentación y se procede a la etapa de lavado.

4.2.10. Purificación de polímeros recombinantes.

Una vez producido el polímero el objetivo es aislarlo de los posibles contaminantes celulares, para ello se llevan a cabo varias etapas de purificación.

En primer lugar, se recoge el concentrado celular del fermentador en botes de centrífuga y se centrifugan 15 minutos a 4°C y 3500 rpm, con el fin de separar la bacteria (pellet) del medio (sobrenadante). Se tira el sobrenadante y el pellet se despega con ayuda de una espátula y se resuspende en tampón de lavado (Tris-base 20mM y NaCl 140mM, pH 8). Se repite este proceso de lavado 3 veces, hasta que el sobrenadante quede transparente, reduciendo el número de botes.

Tras el último lavado, se resuspende el pellet en un volumen de tampón de sonicación (Tris- base 20mM, EDTA 1mM, pH 8), encargado de evitar la degradación del polímero, junto con el inhibidor de proteasas PMSF 1mM, que se encarga de inhibir la ruptura enzimática de proteínas. El volumen de tampón viene dado por la relación:

$$V = 5 \times \text{Absorbancia máxima (600nm)} \times V_{\text{Total}}$$

Una vez lavadas las células se someten a una ruptura celular utilizando para ello un disruptor de células, que se encarga de fracturar la pared celular mediante un cambio de presión con el fin de extraer las proteínas. Este proceso se lleva a cabo a una temperatura de 5°C y una presión aproximada de 1500 bares, sin sobrepasar los 2000 bares. Se pasa tres veces por el disruptor para garantizar la ruptura. Se reparte en botes de centrífuga y se centrifuga durante 1 hora y 30 minutos a 4°C y 14000 rpm.

El sobrenadante obtenido en esta etapa contiene teóricamente el polímero de interés y con él se sigue el proceso de purificación.

Cada polímero ELR tiene un proceso de purificación adaptado a sus propiedades. La técnica de purificación utilizada se denomina *ciclo de transición inversa* (ITC) y consta de varios pasos secuenciales y repetidos de calentamiento, centrifugación, enfriamiento y solubilización. El protocolo seguido para la purificación ha sido el de un (EIS)₂-RGD₆, con cambios de pH y temperatura a los que es sensible el polímero lo que permite la separación del mismo de los contaminantes existentes.

Este proceso comienza con la acidificación del sobrenadante con HCl (1:10) hasta alcanzar un pH= 3,5. Se mantiene con agitación 2 horas a 4°C en la cámara fría. Después, se centrifuga durante 30 minutos a 4°C y 13000 rpm. Se recoge el sobrenadante en frascos blancos de EF y se le añade un 12,5% de sulfato amónico. Se incuba en hielo durante 30 min hasta que se observan dos fases con un precipitado. Se centrifuga de nuevo 30 minutos a 4°C y 13000 rpm. Se descarta el sobrenadante y se conserva el precipitado, que contiene el polímero de interés. Este se resuspende en 200 mL de agua MilliQ (recién cogida) y se mantiene con agitación toda la noche a 4°C (en la cámara fría). Pasado ese tiempo, se centrifuga 30 minutos a 4°C y 13000 rpm. En esta etapa se descarta el precipitado y al sobrenadante se le vuelve añadir un 12,5% de sulfato amónico. Se repite el mismo procedimiento anterior dos veces. La última resuspensión se realiza en 50 mL de MQ.

Durante todas las etapas de la purificación se toman muestras en tubos eppendorf para identificar la existencia de polímero mediante electroforesis de proteínas.

Tras las tres etapas de purificación y obtenido el tercer sobrenadante, se procede a la etapa de diálisis con 25 L de agua MQ a 4°C con agitación continua, realizando cambios cada 24 horas (mínimo 3). Este proceso permite mediante presión osmótica la expulsión de sales que pueden estar contenidas en el polímero, además de un ajuste a pH neutro.

Una vez concluida la etapa de diálisis se filtra la muestra a vacío, se congela a -20°C y finalmente se liofiliza para eliminar todo el agua mediante deshidratación de la muestra, obteniéndose así el polímero puro, que se pesa, se caracteriza con las técnicas deseadas y se conserva a -20°C.

4.2.11. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.

También conocida como electroforesis discontinua SDS-PAGE, sirve para separar las proteínas de acuerdo a su movilidad electroforética. El SDS (dodecil sulfato sódico) desnaturaliza por completo las proteínas y rompe las interacciones no covalentes que determinan la estructura terciaria y cuaternaria. Además proporciona a la molécula carga negativa que permite su migración en un campo eléctrico hacia el cátodo.

Esta electroforesis es discontinua porque está formada por dos geles: el resolving y el stacking. El primero sirve como separador de las proteínas y el segundo es un gel

concentrador con bajo grado de reticulación para generar los pocillos con el peine, donde se introduce la muestra. Ambas partes tienen los mismos componentes pero en proporciones distintas.

Los geles se preparan en función del peso molecular del polímero que se intenta separar. En este caso se han realizado del 10% de resolving y 4% de stacking. Están formados por una mezcla de acrilamida (40%), Tris 1,5M pH 8,8 (para el resolving) y Tris 0,5M pH 6,8 (para el stacking), MilliQ, SDS (10%), persulfato amónico (PSA) (10%) y TEMED. En los geles separadores (resolving) con otro porcentaje varía solo la proporción de acrilamida y de agua respecto al anterior. Por el contrario, el gel compactador (stacking) siempre se realiza del 4%.

Una vez formado el gel, se cargan las muestras en los pocillos, preparadas previamente a un volumen de 20 μ L con 5 μ L de tampón de carga (Loading Buffer 5x) que contiene azul de bromofenol el cual permite visualizar el recorrido de las proteínas tras la tinción. Una vez cargado el gel se desarrolla la electroforesis a temperatura ambiente con una intensidad de corriente constante de 25 mA y voltaje no limitante por gel durante una hora y 30 min aproximadamente. Se utiliza un tampón (Running buffer 5x) compuesto por Tris-base (pH= 8,3), glicina y SDS. La electroforesis concluye cuando el frente marcado por el azul de bromofenol está a punto de alcanzar el final del gel.

Finalizada la electroforesis se realiza una tinción del gel con cloruro de cobre durante unos 10 minutos, se destiñe lavándolo con agua y se miran las bandas a través de un transiluminador. Para la determinación del peso molecular relativo se emplean marcadores de masa molecular conocida.

4.2.12. Caracterización física de polímeros recombinantes.

Se han empleado diferentes técnicas para la caracterización física de un polímero recombinante. Entre ellas:

❖ Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

La espectroscopía de infrarrojo es una técnica que estudia las interacciones entre la materia y el campo electromagnético en la región del infrarrojo (IR). Tiene su aplicación más inmediata en el análisis cualitativo y cuantitativo de los grupos funcionales presentes en la materia.

Cuando la radiación de infrarrojos alcanza la muestra, parte de la radiación es absorbida por ella cambiando su estado energético, dando lugar a una variación en la energía traslacional y en su estado energético vibracional o rotacional, mientras que otra parte la atraviesa.

La intensidad de la luz transmitida a través de la muestra se mide en cada número de onda, esto permite que la cantidad de luz absorbida por la muestra se calcule mediante la diferencia entre la intensidad de la luz antes y después de pasar por la celda de muestra. De esta forma se obtiene el espectro infrarrojo de la muestra.²⁴

Para llevar a cabo la caracterización del polímero se ha utilizado un espectrómetro de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR), en concreto el Bruker TENSOR 27 y el programa de ordenador empleado ha sido el software OPUS.

Se toma una pequeña cantidad del polímero sólido a estudiar y se coloca en la celda infrarroja, donde se somete a una fuente de luz infrarroja que hace un barrido entre las longitudes de onda de 600 a 4000 cm^{-1} . Previamente a esta medida se realiza un background sin muestra a modo de blanco para estabilizar el sistema.

De esta forma se puede obtener información de los grupos funcionales más característicos que presenta la secuencia de aminoácidos del polímero en cuestión.

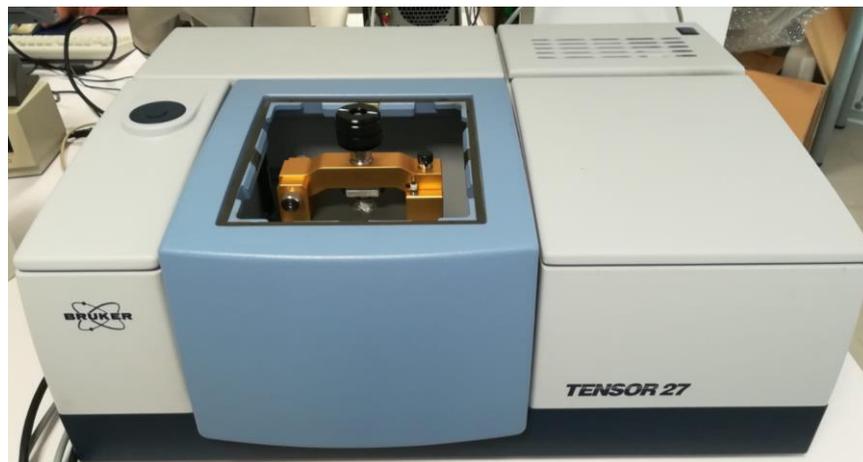


Figura 14: espectrómetro de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR).

❖ **Resonancia magnética nuclear (RMN)**

La espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una de las técnicas más eficientes y útiles en el estudio de la estructura y dinámica de moléculas en disolución.

Es una técnica espectroscópica no destructiva que se basa en las propiedades magnéticas de la materia y se aplica a cualquier sustancia química en estado sólido o líquido que contenga núcleos con espines nucleares. Al aplicar un campo magnético externo se produce un desdoblamiento de los niveles degenerados de energía del spin nuclear, de tal forma que pueden inducirse transiciones entre ellos como consecuencia de la absorción de radiación electromagnética. La intensidad, forma y posición de las señales en el espectro de un determinado núcleo están relacionadas con su estructura molecular, por lo que el análisis detallado del espectro ofrece información importante acerca de la estructura del compuesto que lo origina.

En este trabajo se ha realizado y analizado un espectro de RMN de ^1H para obtener una proporción aproximada de los aminoácidos que componen el polímero, así como los diferentes grupos funcionales que contiene.

Para ello se coge una muestra de 4 mg del polímero y se disuelve en 0,5-0,6 ml de DMSO deuterado. Una vez disuelto se introduce en un tubo de RMN y se realiza la medida. Esta se lleva a cabo en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) del Parque Tecnológico de la Universidad de Valladolid, utilizando un equipo RMN 500 de Agilent Technologies.

❖ **Espectroscopía de masas (MALDI-TOF)**

La espectrometría de masas es una técnica analítica que permite identificar la cantidad y el tipo de compuestos químicos presentes en una muestra, ofreciendo información cualitativa o cuantitativa. Esta técnica proporciona información sobre la masa molecular y la estructura del compuesto analizado. Para ello es necesario ionizar las moléculas en la fuente de ionización y obtener los iones formados en fase gaseosa. Estos iones son acelerados hacia un analizador y separados en función de su relación masa/carga (m/z) mediante la aplicación de campos eléctricos, magnéticos o determinando el tiempo de llegada al detector. Una vez que los iones llegan al detector producen una señal eléctrica que se procesa y amplía dando lugar al espectro de masas.

En este estudio se ha empleado la espectrometría de masas MALDI-TOF (desorción/ionización láser asistida por matriz con detección de masas por tiempo de vuelo) que se trata de una técnica de ionización suave utilizada en espectrometría de masas que permite el análisis de biomoléculas y moléculas orgánicas grandes (ej. polímeros) que tienden a hacerse frágiles y fragmentarse cuando son ionizadas por métodos más convencionales.

Para llevar a cabo este estudio se toma una muestra de 1 mg del polímero sólido y se lleva al LTI donde se realiza la medida. El equipo empleado es un Espectrómetro de masas de tiempo de vuelo con ionización por desorción láser asistida por matrices (MALDI-TOF) Bruker Autoflex.

❖ **Reología**

La reología es la ciencia que estudia la deformación y el flujo de la materia. Describe la interrelación entre fuerza, deformación y tiempo.

El comportamiento reológico de un material permite saber cómo se va a deformar al ser sometido a esfuerzos mecánicos y térmicos.

Este proceso requiere conocer cómo la temperatura, presión, tasa de deformación, peso molecular y estructura, afectan la viscosidad en fundido.

Las propiedades mecánicas estudiadas por la reología se pueden medir mediante reómetros, instrumentos de precisión que contiene el material de interés en una configuración geométrica, controla el ambiente que lo rodea y aplica y mide amplios rangos de esfuerzo, deformación y velocidad de deformación.

En este trabajo, las propiedades mecánicas del gel se han determinado mediante pruebas reológicas en un reómetro de esfuerzo controlado (AR 2000ex, TA Instruments) equipado con un control de temperatura de placa Peltier.

Las muestras se han preparado disolviendo 175mg/mL del polímero en PBS y glucosa, un día antes de la medida.

Se han realizado dos estudios. Para ello se ha utilizado una geometría de placa paralela con un volumen de muestra de 150-200 μL . En el primer estudio, se han colocado las muestras una a una (dilución PBS y glucosa) sobre el plato termostaticado a una temperatura constante de 37°C, añadiendo agua alrededor para que no se evapore la

muestra al calentar, y se han sometido a una deformación mediante un pistón. La cinética de gelificación se ha llevado a cabo a una tensión constante de 0,2% y una frecuencia de 1 Hz. Se han realizado tres medidas: gelificación a T^a constante (37°C), variación de la amplitud de la cizalla a frecuencia fija (1Hz) y variación en la frecuencia a una amplitud fija (0,2%).

En el segundo estudio se ha realizado una rampa de temperatura entre 4 y 37°C a una velocidad de 2,5 °C/min, con una tensión de 0,2% y una frecuencia de 1 Hz constantes.

Estas mediciones permiten obtener los parámetros: G' , G'' y $\tan \delta$.

G' es el módulo elástico o de almacenamiento, puede usarse como un indicador de la porción elástica del material alcanzando un máximo cuando la deformación es puramente elástica. G'' es el módulo de pérdida o viscosidad, está relacionado con la disipación de energía dentro del material durante un ciclo de esfuerzo. Y δ es la tangente de pérdidas (ratio entre G'' y G'), indica el desplazamiento de la tensión respecto de la fase de la deformación. Un valor elevado de la tangente significa que el material presenta un comportamiento altamente inelástico a la deformación, mientras que un valor pequeño caracteriza a los materiales que se comportan fundamentalmente como elásticos.



Figura 15: reómetro con plato termostatado.

❖ **Secuenciación del DNA**

La secuenciación automática de muestras de DNA se lleva a cabo en Cenit Support Systems S.L., Parque Científico de Salamanca (Villamayor) utilizando los primers específicos de cada plásmido.

La secuenciación es el proceso que determina en qué orden se disponen las bases de los nucleótidos (Adenina (A), Timina (T), Citosina (C) y Guanina (G)) de un fragmento de DNA.

La secuencia aporta la información genética que se transporta en un segmento específico de DNA.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. CONSTRUCCIÓN DE GENES QUE CODIFICAN LOS POLÍMEROS

Los primeros objetivos de este trabajo han consistido en la construcción de nuevos polímeros proteicos de tipo ELR. Su obtención, mediante biosíntesis, se ha iniciado con la construcción de un gen sintético, para ser posteriormente introducido en un sistema de producción bacteriano. Los polímeros están diseñados para ser empleados principalmente en aplicaciones biomédicas, como implantes o como vectores de agentes terapéuticos. En este trabajo se han mejorado dotándoles de un fragmento que pudiera permitir el seguimiento tras su implantación en los tejidos huéspedes. Mediante el seguimiento en el paciente es posible determinar su eficacia, o la entidad de los efectos de cuerpo extraño. El fragmento peptídico que nos permite identificar los ELR en tejido está constituido por seis aminoácidos histidinas consecutivos. Para su obtención partimos del vector que contiene la secuencia génica: pDAll His6 Tag. Se pretende introducirle tres insertos distintos que codifican tres polímeros, con diferentes propiedades mecánicas y físicas. De este modo, obtendremos como productos finales tres moléculas que contienen los constituyentes funcionales en el orden y proporción deseados. Los tres insertos génicos estarán contenidos en vectores plasmídicos que permiten su correcta producción.

La estrategia de clonación para obtener los genes es similar en los tres casos. Se comienza con la digestión del vector que contiene la secuencia de seis histidinas, pDAll His6 Tag, con la enzima de restricción *SapI* que digiere en un solo sitio el ADN, generando un plásmido lineal con extremidades que permiten la inserción de ADN en el punto de finalización del His6. A continuación, se realizan dos defosforilaciones enzimáticas consecutivas (FastAP y SAP) de los extremos del vector para eliminar los grupos fosfato de la cadena e impedir así la recirculación del plásmido lineal sin haber integrado los nuevos genes. Estos procedimientos preparan el plásmido para la clonación del gen, o inserto, generando un plásmido recombinante.

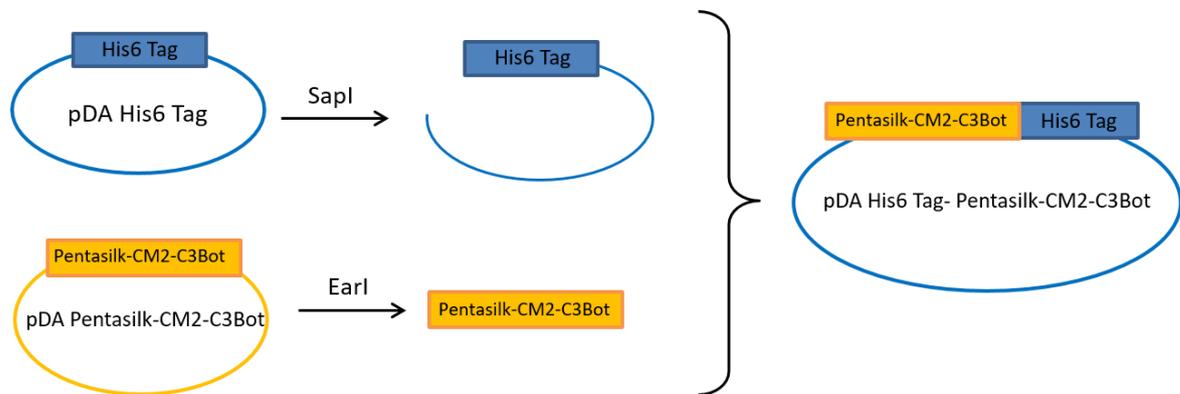
Paralelamente se lleva a cabo la digestión de los tres plásmidos que contienen los genes de los polímeros, con la enzima de restricción *EarI*. Esta enzima digiere la secuencia de ADN exactamente a los extremos de los genes requeridos, obteniéndolos en forma de insertos (Pentasilk-CM2-C3Bot, C3Bot-Pentasilk y Pentasilk). La digestión además genera extremidades complementarias a la generada por *SapI* para obtener una unión

unidireccional y específica. El plásmido y los insertos se purifican desde la mezcla de reacción.

Finalmente se realiza la ligación del plásmido pDA His6 Tag con los tres insertos con el fin de realizar la clonación y se transforma en cepas bacterianas amplificando y aislando de esa forma el gen con el plásmido pDA.

A continuación, se representa esquemáticamente la construcción de los tres genes:

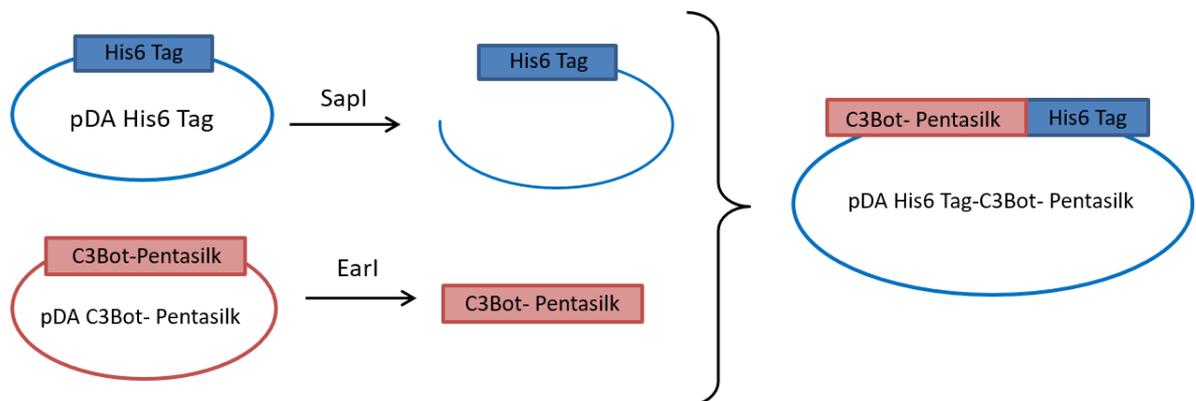
❖ **Construcción del gen 1: *pDA His6 Tag-Pentasilk-CM₂-C₃Bot***



Esquema 1: construcción del gen pDA His6 Tag-Pentasilk-CM₂-C₃Bot.

Cada inserto se caracteriza por presentar una determinada secuencia de bloques que le atribuye diferentes propiedades (punto 4.1.6).

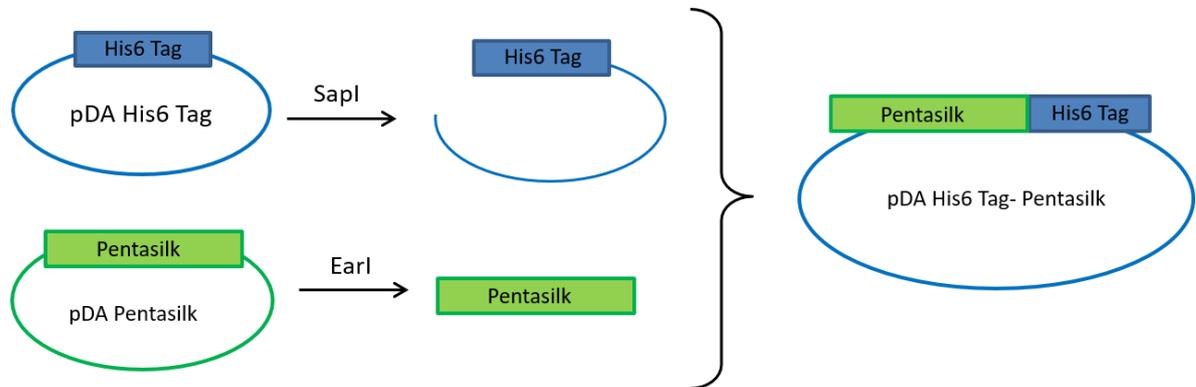
❖ **Construcción del gen 2: *pDA His6 Tag-C₃Bot-Pentasilk***



Esquema 1: construcción del gen pDA His6 Tag-C₃Bot-Pentasilk.

La secuencia de bloques del inserto C₃Bot-Pentasilk difiere de la anterior en la posición del C₃Bot y la ausencia del fragmento CM₂ que es sensible a metaloproteasas.

❖ Construcción del gen 3: *pDA His6 Tag- Pentasilk*



Esquema 1: construcción del gen pDA His6 Tag-Pentasilk.

5.2. SÍNTESIS DE GENES RECOMBINANTES

La síntesis de los genes es similar en los tres casos.

En primer lugar, se lleva a cabo la producción a larga escala del plásmido que contiene el péptido H6, pDA His6 Tag. Se realiza la transformación del pDA His6 Tag con las células XL1-Blue Subcloning Grade, tal y como se ha explicado anteriormente (punto 4.2.8), para amplificar el plásmido entero ya secuenciado. Obtenidas las colonias, tras una incubación de toda la noche, se procede a su inoculación en medio LB con los correspondientes antibióticos. A continuación, se ha realizado su purificación siguiendo el protocolo de *NucleoSpin Plasmid/Plasmid (NoLid)* (punto 4.2.3), obteniéndose así primeras y segundas eluciones con diferentes concentraciones. Con una de las primeras eluciones, en este caso la de mayor concentración (911 ng/ μ L), se procede a su digestión preparativa con la enzima *SapI* (punto 4.2.5). Se realiza previamente un gel analítico (punto 4.2.1) (Figura 16) para analizar las características de las colonias obtenidas y comprobar el estado del plásmido observando si la digestión ha sido correcta. Una vez comprobado que el plásmido se ha digerido correctamente se lleva a cabo la primera defosforilación con la enzima fosfatasa FastAP (punto 4.2.6) y se realiza un gel preparativo para separar la banda de interés y recuperar el DNA tras el proceso de digestión. Se recorta la banda

deseada, en este caso presenta 3937 pares de bases (Figura 17). Se purifica mediante el sistema *PureLink Quick Gel Extraction Kit* (punto 4.2.3). Una vez purificado el plásmido se realiza la segunda defosforilación con la enzima fosfatasa SAP (punto 4.2.6). Llegados a este punto ya se tiene el plásmido linearizado y defosforilado listo para llevar a cabo la ligación.

En la Figura 16 se muestra un gel de agarosa analítico donde se comprueba como la digestión del plásmido con la enzima *SapI* produce la digestión del vector en un único segmento, es decir, lo lineariza, dando lugar en la electroforesis a una única banda que se observa en la calle 1 de tamaño correspondiente al plásmido lineal (3937 pb). En la calle 2 correspondiente al plásmido sin digerir se observan tres bandas que representan las distintas formas en las que puede encontrarse el DNA plasmídico: circular, semi-lineal y superenrollado (respectivamente de arriba a abajo). Las moléculas superenrolladas avanzan más rápido que las lineales y estas a su vez más rápido que las circulares.

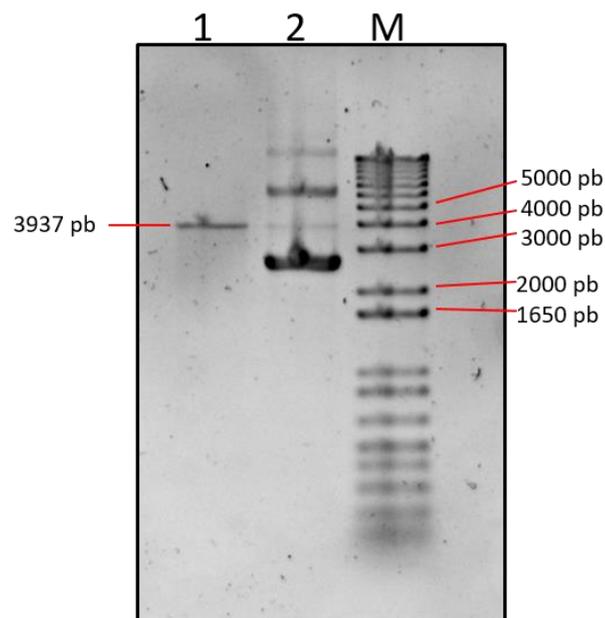


Figura 16: Electroforesis de digestión analítica de pDA His6 Tag en gel de agarosa al 1%

La calle 1 representa el pDA His6 Tag digerido con *SapI*. La calle 2 el plásmido sin digerir. La calle M el marcador 1 kbPlus DNA Ladder.

Una vez comprobado mediante el gel analítico la presencia de la banda deseada y por tanto que la digestión ha sido correcta se realiza el gel preparativo. Así, en la Figura 17

puede observarse en la imagen A la banda correspondiente al plásmido (3937 pb). En la imagen B se observa el gel tras el recorte de la banda correspondiente al plásmido.

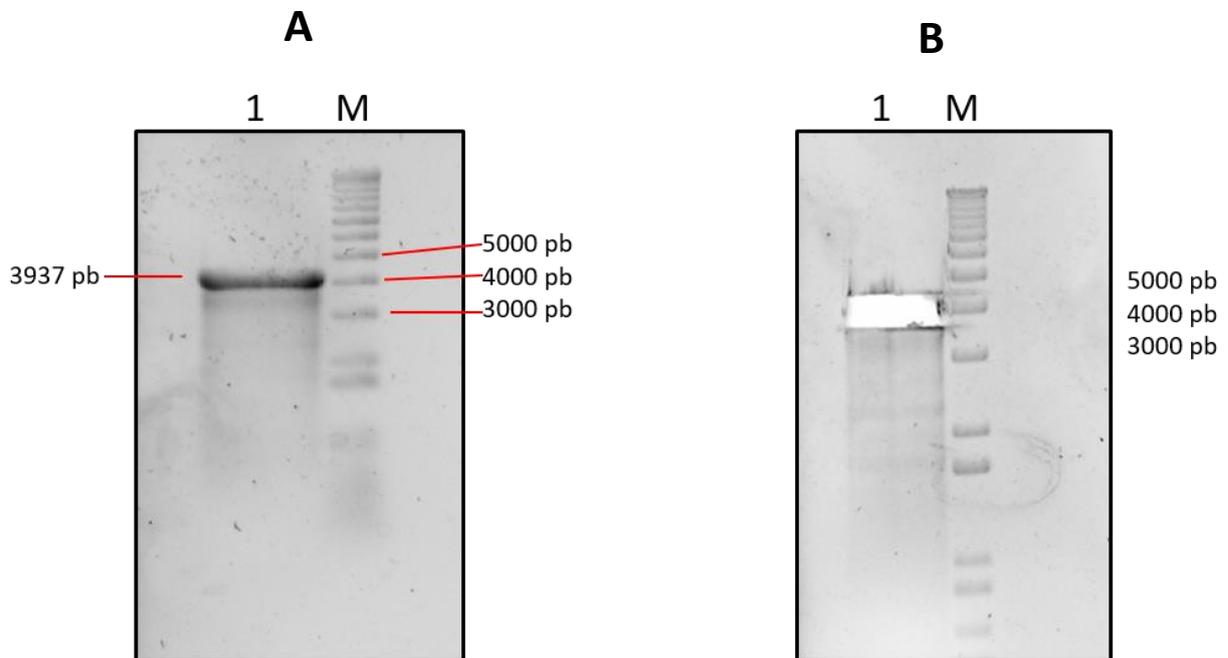


Figura 17: Electroforesis de digestión preparativa con *SapI* del pDA His6 Tag en gel de agarosa al 1%. Imagen A con la banda deseada del vector lineal. Imagen B con la banda recortada tras haber prolongado la electroforesis.

La calle 1 representa el pDA His6Tag digerido con *SapI*. La calle M el Marker 1 kbPlus DNA Ladder.

Para la obtención de los distintos genes de los ELRs en forma de insertos, Pentasilk-CM₂-C₃Bot, C₃Bot-Pentasilk y Pentasilk, se lleva a cabo el mismo proceso en los tres casos.

Se comienza con la digestión preparativa de los plásmidos en los cuales están insertados utilizando la enzima de restricción *EarI* que digiere a los extremos del gen, tal como se muestra en los esquemas 1,2 y 3 (punto 5.1), además de otros tres sitios contenidos en la secuencia del plásmido (punto 4.2.5). La digestión con *EarI* produce fragmentos de 250, 637, 1626 y 1742 pares de bases derivados de la fragmentación del vector además del inserto que contiene. Al igual que en el caso anterior del vector, se realiza previamente un gel analítico para comprobar que la digestión es correcta y aparecen las bandas de interés. Una vez comprobado que los plásmidos se han digerido correctamente se realiza un gel preparativo para separar las bandas de interés y poder aislar los insertos que tienen diferentes pesos moleculares Pentasilk-CM₂-C₃Bot (4440 pb), C₃Bot-Pentasilk (4281 pb)

y Pentasilk (4191 pb). Estos se purifican mediante *PureLink Quick Gel Extraction Kit* (punto 4.2.3). Una vez purificados ya están listos para llevar a cabo la ligación con el pDA His 6Tag (Esquemas 1, 2 y 3).

La enzima de restricción *EarI* digiere dando lugar a cuatro fragmentos (250-637-1262-1742 pb) más el inserto correspondiente. En la imagen A de la Figura 18 de la electroforesis se observan las bandas de los fragmentos 1742 pb y 1262 pb pero no se llegan a observar con claridad las de 637 pb y 250 pb. Se observan también las bandas deseadas de los insertos en la calle 1 (PCC (Pentasilk- CM₂-C₃Bot)) y en la calle 3 (Pentasilk) entre 4000 y 5000 pb. Sin embargo, no se observa ninguna banda en la calle 2, por lo tanto no hay inserto C3Bot-Pentasilk. Tras repetir varias veces la electroforesis no se ha conseguido observar ninguna banda para el C3Bot-Pentasilk, por lo que finalmente el trabajo se ha centrado en la utilización de los insertos PCC y Pentasilk únicamente.

En la imagen B se observan los cortes de los insertos PCC (calle1) y Pentasilk (calle 3).

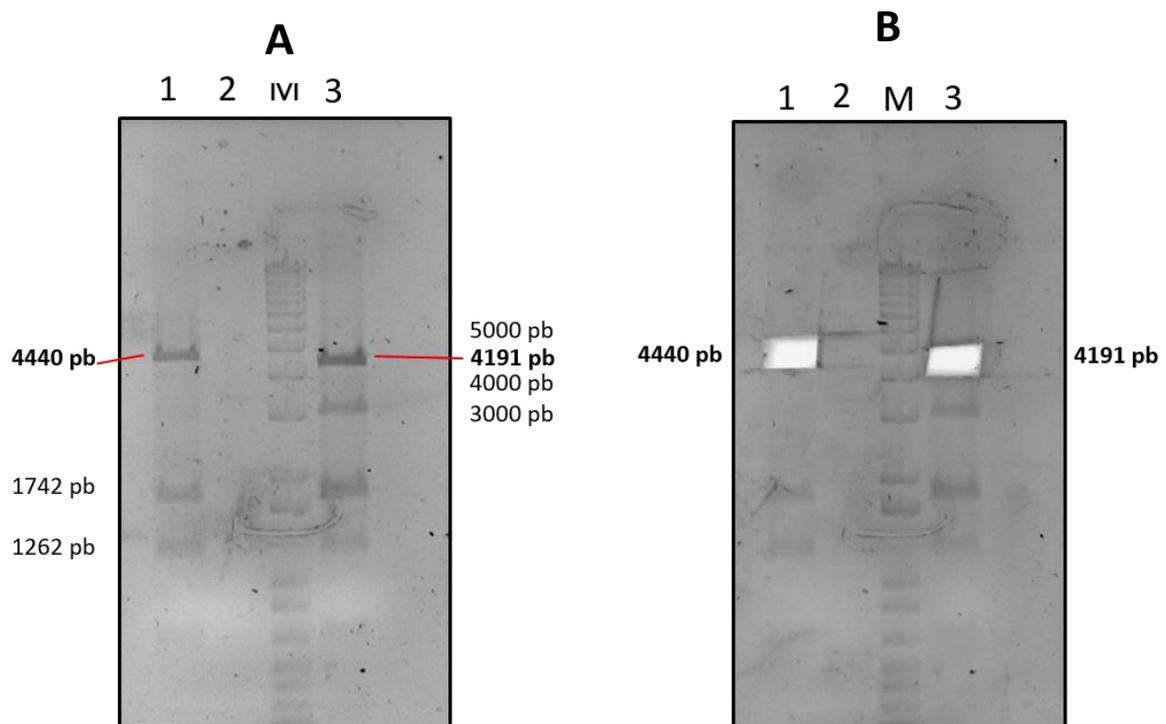


Figura 18: Electroforesis de digestión preparativa con *EarI* de insertos en gel de agarosa al 1%.

Imagen A con las bandas deseadas de los insertos. Imagen B con los recortes de los insertos.

La calle 1 representa el Pentasilk- CM₂-C₃Bot. La calle 2 el C₃Bot-Pentasilk. La calle M el Marker 1 kbPlus DNA Ladder. La calle 3 el Pentasilk.

A lo largo del trabajo se ha llevado a cabo también una digestión diagnóstica de los insertos PCC y Pentasilk con diferentes enzimas de restricción Fast Digest para comprobar si digerían correctamente, ya que no se obtenían buenos resultados con la enzima *EarI* empleada anteriormente.

En la Figura 19, correspondiente a la electroforesis, se muestra el resultado obtenido.

Como se puede apreciar en la imagen A se observan las bandas deseadas de los insertos alrededor de 4440 (PCC) y 4191 (Pentasilk) pb. Sin embargo, aparecen otras bandas no deseadas o en algunos casos no se ven todas las que se esperarían.

Por el contrario, en la imagen B no se observan las bandas con claridad por lo tanto no permite sacar conclusiones concisas acerca de las digestiones.

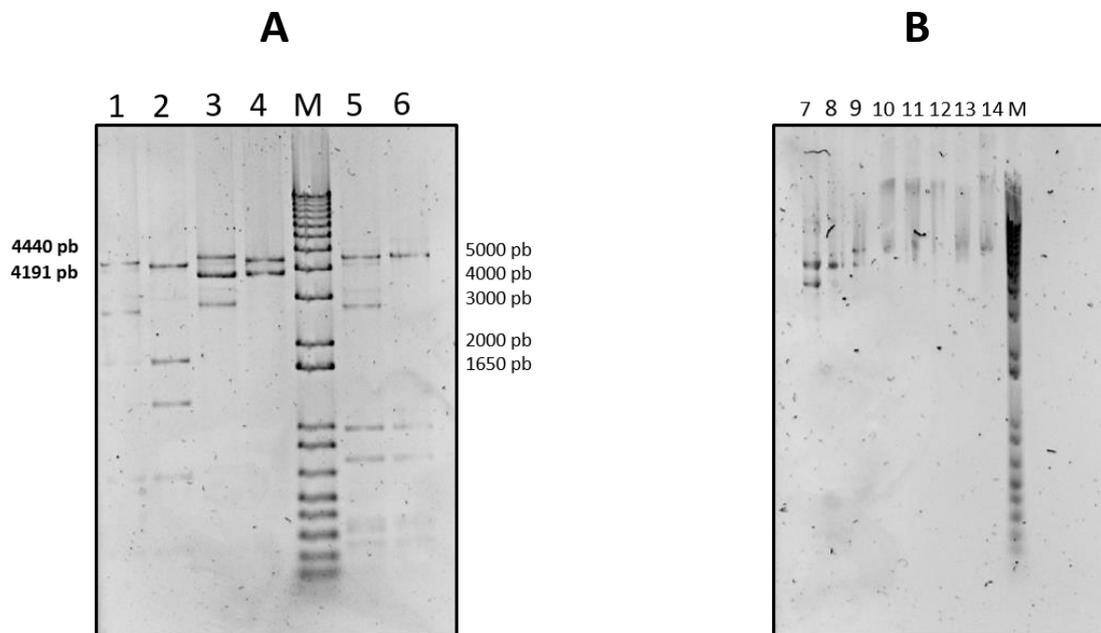


Figura 19: Electroforesis de digestión diagnóstica de insertos con diferentes enzimas de restricción Fast Digest en gel de agarosa al 1%.

La calle 1 representa el PCC digerido con *EarI*. Calle 2 Pentasilk digerido con *EarI*. Calle 3 PCC digerido con *EcoRI*. Calle 4 Pentasilk digerido con *EcoRI*. Calle M, Marker 1 kbPlus DNA Ladder. Calle 5 PCC digerido con *DpNI*. Calle 6 Pentasilk digerido con *DpNI*. Calle 7 PCC sin digerir. Calle 8 Pentasilk sin digerir. Calle 9 PCC digerido con *XhoI*. Calle 10 Pentasilk digerido con *XhoI*. Calle 11 PCC digerido con *XbaI*. Calle 12 Pentasilk digerido con *XbaI*. Calle 13 PCC digerido con *HindIII*. Calle 14 Pentasilk digerido con *HindIII*. Calle M Marker 1 kbPlus DNA Ladder.

Una vez preparado el DNA plasmídico (pDA His6 Tag) y los dos insertos (PCC y Pentasilk), se lleva a cabo la clonación tal y como se ha explicado anteriormente (punto 4.2.7). Y posteriormente la transformación bacteriana con la cepa de E. coli XL1-Blue Competent Grade (punto 4.2.8).

Tras la transformación se debe observar la aparición de colonias en las placas. Se seleccionan algunas de ellas para analizar el resultado del clonaje. A continuación, se realiza la extracción y purificación del DNA plasmídico. Una vez purificado, se realiza una digestión con la enzima EcoRI, que fragmenta la cadena separando el vector pDA del inserto. Obtenido el inserto se introduce en un vector de expresión para obtener el polímero que se bioproduce, purifica y caracteriza con diferentes técnicas.

Durante las primeras clonaciones no se han llegado a obtener buenas colonias, por ello se han realizado hasta siete clonaciones tratando de averiguar la causa del problema variando diferentes factores del proceso como tiempos de incubación, volúmenes de alícuotas, diferentes lotes y cantidades de enzima, diferentes bacterias de transformación, placas de cultivo, antibióticos, etc.

A continuación, se muestra en las tablas 3 y 4 las condiciones propuestas para las distintas clonaciones llevadas a cabo.

		Clonaciones						
		1	2	3	4	5	6	7
pDA His6 Tag		3 µL	3 µL	5 µL	3 µL	4 µL 2 µL	2 µL	3 µL
Insertos	PCC	15 µL	10 µL	12 µL	10 µL	10 µL	16 µL	15 µL
	Pentasilk	15 µL	10 µL	12 µL	10 µL	6 µL	16 µL	10 µL
Enzima T4 Ligasa		0,5 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	0,3 µL	1 µL
Buffer 10x		2 µL	1,5 µL	2 µL	1,5 µL	1,5 µL 1 µL	2 µL	2 µL 1,5 µL
Volumen total		20,5 µL	15,5 µL	20 µL	15,5 µL	variable	20,3 µL	21 µL 15,5 µL

Tabla 3: Condiciones de volumen de las reacciones de ligación de pDA His6 Tag con PCC y Pentasilk

Clonación	Plásmido pDA His6	Insertos		Transformación	Resultados
		PCC	Pentasilk		
1	28,7 ng/μL	8,1 ng/μL	9,7 ng/μL	XL1 Blue Competent	Alfombra de colonias
2	17,1 ng/μL	8,1 ng/μL	9,7 ng/μL	XL1 Blue Competent	Alfombra de colonias
3	17,1 ng/μL	9,6 ng/μL	10,5 ng/μL	XL1 Blue Competent	Ninguna colonia
4	31,9 ng/μL	9,6 ng/μL	10,5 ng/μL	XL1 Blue Competent	Ninguna colonia
5	17,1 ng/μL 31,9 ng/μL	8,0 ng/μL	14,0 ng/μL	XL1 Blue Competent	Ninguna colonia
6	31,9 ng/μL	Mezcla: 8,0 ng/μL + 9,6 ng/μL + 0,4 ng/μL	14,0 ng/μL	XL1 Blue Competent NZY5α Competent	Sí colonias, pocas, con NZY5α
7	34,1 ng/μL	8,2 ng/μL	16,8 ng/μL	NZY5α Competent	Sí colonias, pocas y pequeñas

Tabla 4: Concentraciones y resultados de las reacciones de ligación de pDA His6 Tag con PCC y Pentasilk.

Las posibles causas que se han valorado respecto a los resultados negativos obtenidos en las clonaciones son las siguientes:

❖ Respecto al vector:

- Una digestión incompleta o parcial.
- Una defosforilación ineficaz o parcial. Las enzimas fosfatasas tienen como la mayoría de las enzimas de origen bacteriano diferentes actividades además de su actividad principal. Sin embargo, si sobreactúa una acción exonucleásica puede digerir las extremidades necesarias para la unión complementaria con los insertos.
- La acción exonucleasica de la enzima SAP puede actuar digiriendo los extremos.
- Una sobreactuación de las endonucleasas (*SapI* y *EarI*), digiriendo los extremos.

❖ Respecto a los insertos:

- Una co-purificación de la banda inespecífica.
- Una sobreactuación de las endonucleasas (*SapI* y *EarI*), digiriendo los extremos.

❖ Respecto a las células o bacterias:

- Las células que se utilizan son cepas modificadas genéticamente de *E. coli*, para que sean sistemas de clonación más eficientes. Una de las posibles causas de los resultados obtenidos es la pérdida de eficiencia de estas, ya que en estos clonajes se necesitan eficiencias en torno a 10^8 . Por ello se ha realizado un cálculo de la eficiencia de transformación (TE) de las dos cepas bacterianas utilizadas en las clonaciones.

La TE se define como el número de unidades formadoras de colonias (cfu) que se producirían transformando 1 μg de plásmido en un volumen dado de células competentes.

Ecuación de la eficiencia de transformación:

$$\text{TE} = \text{colonias} / \mu\text{g} / \text{dilución}$$

Siendo:

colonias= número de colonias contadas en la placa

μg = cantidad de DNA transformado expresado en μg

dilución= dilución total del DNA antes de colocar en la placa

De esta forma los valores de TE obtenidos han sido:

- XL1 Blue Competent: 1×10^6 cfu/ μg
- NZY5 α Competent: 1×10^8 cfu/ μg

Por tanto ambas cepas son bastante eficientes.

❖ Otra de las posibles causas es el uso de antibióticos, como la Ampicilina o Kanamicina, ya que la primera es termoestable y su actividad se mantiene durante un mes si se conserva a 4°C.

Pese a los diferentes cambios llevados a cabo y tras continuar con el estudio repitiendo el mismo procedimiento, finalmente se han conseguido colonias aisladas para el pDA His6 Tag-Pentasilk-CM2-C3Bot y el pDA His6 Tag-Pentasilk. Se realiza una extracción y purificación del DNA plasmídico y se somete a una digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *EcoRI*. Esta última corta la cadena de DNA separando el vector pDA del inserto añadiendo 100 pb al fragmento correspondiente al pDA. Mediante una electroforesis se comprueba el resultado de la transformación.

A continuación, se muestran dos gels (Figura 20) en los que pueden verse las bandas deseadas correspondientes a los genes tras su digestión con las enzimas de restricción *EarI* y *EcoRI*. Puede observarse en las imágenes A y B el resultado positivo de la clonación.

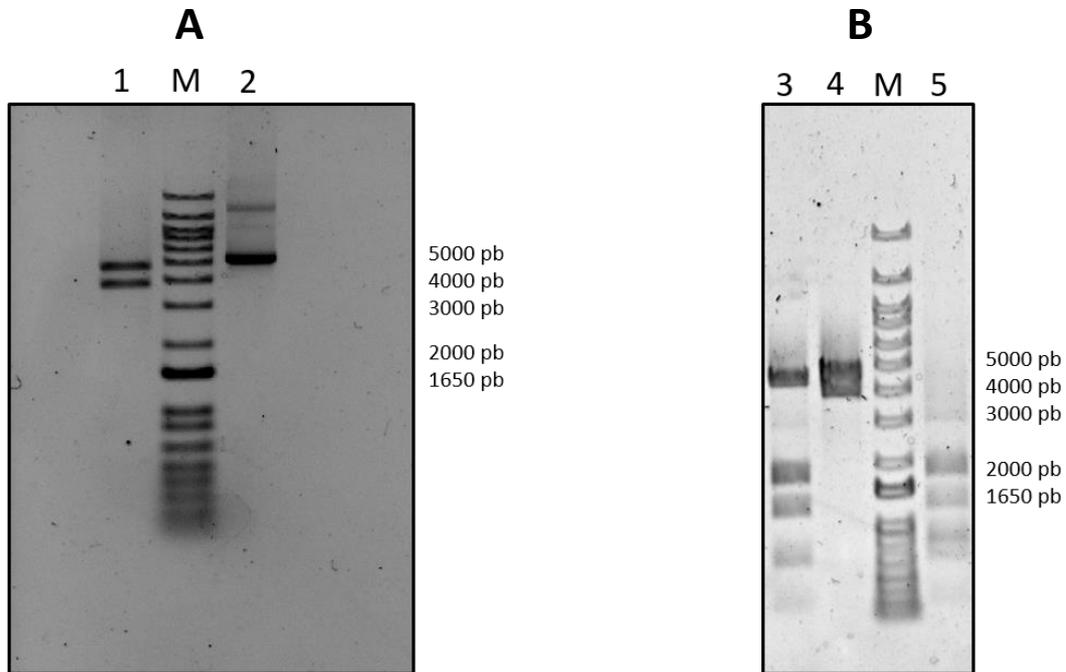


Figura 20: Electroforesis de digestión analítica de clones positivos de PCC y Pentasilk en gel de agarosa al 1%. La calle 1 representa el pDA His6 PCC digerido con *EcoRI*. La calle M el Marker 1 kbPlus DNA Ladder. La calle 2 el pDA His6 PCC sin digerir. La calle 3 el pDA His6 Pentasilk digerido con *EarI*. La calle 4 el pDA His6 Pentasilk digerido con *EcoRI*. La calle 5 el pDA His6 PCC digerido con *EarI*.

A continuación, se secuencía el DNA de los clones positivos obtenidos para confirmar que la clonación es correcta. La secuencia obtenida para el pDA His6 Tag-Pentasilk es la siguiente:

```

1      TGGGCCCCACAGTGTGGTCTAGAGCTAGCCTAGGCTCGAGAAGCTTGTGCGACGAATTCAGATTACCCCGGGAACGGCAG      80
1      ACCCGGGGTGCACACCAGATCTCGATCGGATCCGAGCTCTTGAACAGCTGCTTAAGTCTAATGGGGCCCTTGCCGTC      80
      P G G R T T * L * G L S S F S T S S N L N G G P V A P
      BslI Hpy188III SmlI HindIII SalI EcoRI AvaI

81     GACTTTAGCGACTCTTCTTACGCCGCCACCGCCACCATGATGATGGTGATGATGACCGACACCACCGCCTACGCTGGAC      160
81     CTGAAATCGCCTGAGAAGAATGCGGCGGTGGCGGTGGTACTACTACTACTACTGGCTGTGGTGGCGGATGCGACCTG      160
      S * R V R R V G G G G G H H H H H H G V G G G V S S
      MlyI EarI MwoI BccI BstXI HphI BcgI

161    GCAGGAGAGTCGCCACGACCGGTCACTGCACCAATGCCTGGAACACCGATGCCCGGCACACCAATGCCCGGAACACCGAT      240
161    CGTCCTCTCAGCGGTGCTGGCCAGTACGCTGGTTACGGACCTTGTGGCTACGGGCCGTGTGGTTACGGCCCTTGTGGCTA      240
      A P S D G R G T V A G I G P V G I G P V G I G P V G I

241    GCCCGGCACACCGATGCCTGGTACGCTGGACGAGAGTGCACGACCGGTCACTGCACCAATGCCTGGAACACCGA      320
241    CGGGCCGTGTGGTACGGACCATGCGACCTGCGTCTCTCAGCGGTGTGGCCAGTACGCTGGTTACGGACCTTGTGGCT      320
      G P V G I G P V S S A P S D G R G T V A G I G P V G I

321    TGCCCGGCACACCAATGCCCGGAACACCGATGCCCGGCACACCGATGCCTGGTACGCTGGACGACGAGAGTGCACCA      400
321    ACGGGCCGTGTGGTTACGGCCCTTGTGGCTACGGCCGTGTGGCTACGGACCATGCGACCTGCGTCTCTCAGCGGTGCT      400

```

G P V G I G P V G I G P V G I G P V S S A P S **D G R**

401 CCGGTCACTGCACCAATGCCTGGAACACCGATGCCCGGCACACCAATGCCCGGAACACCGATGCCCGGCACACCGATGCC 480
 401 GGCCAGTGACGTGGTTACGGACCTTGTGGCTACGGGCCGTGTGGTTACGGGCCCTTGTGGCTACGGGCCGTGTGGCTACGG 480
 G T V A G I G P V G I G P V G I G P V G I G P V G I G P V G I G

481 TGGTACGCTGGACGACGAGAGTGCACCACCGGTCACCTGCACCAATGCCTGGAACACCGATGCCCGGCACACCAATGC 560
 481 ACCATGCGACCTGCGTCTCTCAGCGGTGCTGGCCAGTGCAGTGGTTACGGACCTTGTGGCTACGGGCCGTGTGGTTACG 560
 P V S S A P S **D G R** G T V A G I G P V G I G P V G I G

561 CCGGAACACCGATGCCCGGCACACCGATGCCTGGTACGCTGGACGACGAGAGTGCACCACCGGTCACCTGCACCAATG 640
 561 GGCTTGTGGCTACGGGCCGTGTGGCTACGGACCATGCGACCTGCGTCTCTCAGCGGTGCTGGCCAGTGCAGTGGTTAC 640
 P V G I G P V G I G P V S S A P S **D G R** G T V A G I

641 CCTGGAACACCGATGCCCGGCACACCAATGCCCGGAACACCGATGCCCGGCACACCGATGCCTGGTACGCTGGACGACG 720
 641 GGACCTTGTGGCTACGGGCCGTGTGGTTACGGGCCCTTGTGGCTACGGGCCGTGTGGCTACGGACCATGCGACCTGCGTCC 720
 G P V G I G P V G I G P V G I G P V G I G P V G I G P V S S A P

721 AGAGTCGCCACGACCGGTCACCTGCACCAATGCCTGGAACACCGATGCCCGGCACACCAATGCCCGGAACACCGATGCCCG 800
 721 TCTCAGCGGTGCTGGCCAGTGCAGTGGTTACGGACCTTGTGGCTACGGGCCGTGTGGTTACGGGCCCTTGTGGCTACGGGC 800
 S **D G R** G T V A G I G P V G I G P V G I G P V G I G P V G I G P

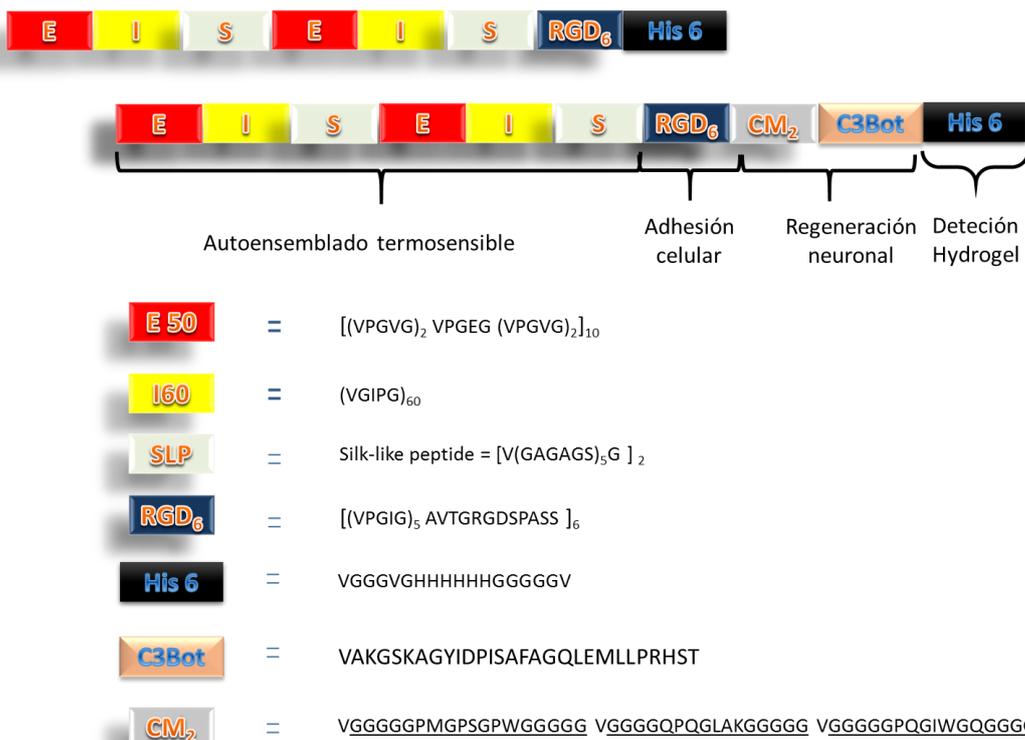
801 GCACACCGATGCCTGGTACGCCAGAACCAGCGCCCGCACCGGAGCCTGCACCAGCGCCGCTACCCGCGCCTGCACCAGAG 880
 801 CGTGTGGCTACGGACCATGCGGTCTTGGTCGCGGGCGTGGCCTCGGACGTGGTCGCGCGATGGGCGCGGACGTGGTCTC 880
 V G I G P V G S G A G A G S G A G A G S G A G A G S

881 CCGGCACGACGCGCGGAACCCGCGACTGGACCTACGCCAAAACAGCGCCCGCACCGGAACCTGCACCAGCGCCGCTACC 960
 881 GGCCGTGGTTCGCGGCCCTTGGCGCTGACCTGGATGCGGTTTTGGTCGCGGGCGTGGCCTTGGACGTGGTTCGCGCGGATGG 960
 G A G A G S G A V P G V G F G A G A G S G A G A G A G S

961 CCGGCCGTCACCAGAGCCCGCACCGCGCCGAACCCGCGCCTGCACCTACACCAGGGATACCAACGCCCGGGATACCCA 1040
 961 GCCCGGACGTGGTCTCGGCCGCTGGTCGCGGCCCTTGGCGCGGACGTGGATGGTCCCTATGGTTGGCGGCCCTATGGGT 1040
 P G A G S G A G A G S G A G A G V G P I G V G P I G V

1041 CGCCCGGAAGC 1051
 1041 GCGGGCCTTCG 1051
 G P L

La secuencia es correcta. En amarillo puede observarse como las seis histidinas están correctamente insertadas tras el dominio RGD (secuencia de aminoácidos en negrita). Resumiendo, se ha obtenido la construcción génica que codifica los polímeros proteicos esquematizados a continuación.



Una vez confirmado el carácter positivo de los clones se introducen en un vector de expresión pET7 RARE. El proceso de digestión, purificación, defosforilación y ligación en estos vectores de expresión es similar al de los vectores de clonación (pDA).

Realizada la transformación bacteriana se obtienen colonias aisladas que se extraen y purifican.

Después se ha realizado una digestión con una mezcla de cuatro enzimas de restricción, XhoI+ XbaI y NdeI+EcoRI, y una electroforesis (Figura 21) para comprobar el resultado de la transformación.

La digestión con XhoI+ XbaI debe dar como resultados dos bandas a 4486 y 5378 pb. Con NdeI+EcoRI deben aparecer bandas a 5452 y 4412 pb.

Observando las imágenes A y B de la figura 21 puede confirmarse que salvo en la colonia 2 que ha dado negativo el resto de las colonias se han transformado correctamente en el plásmido de expresión.

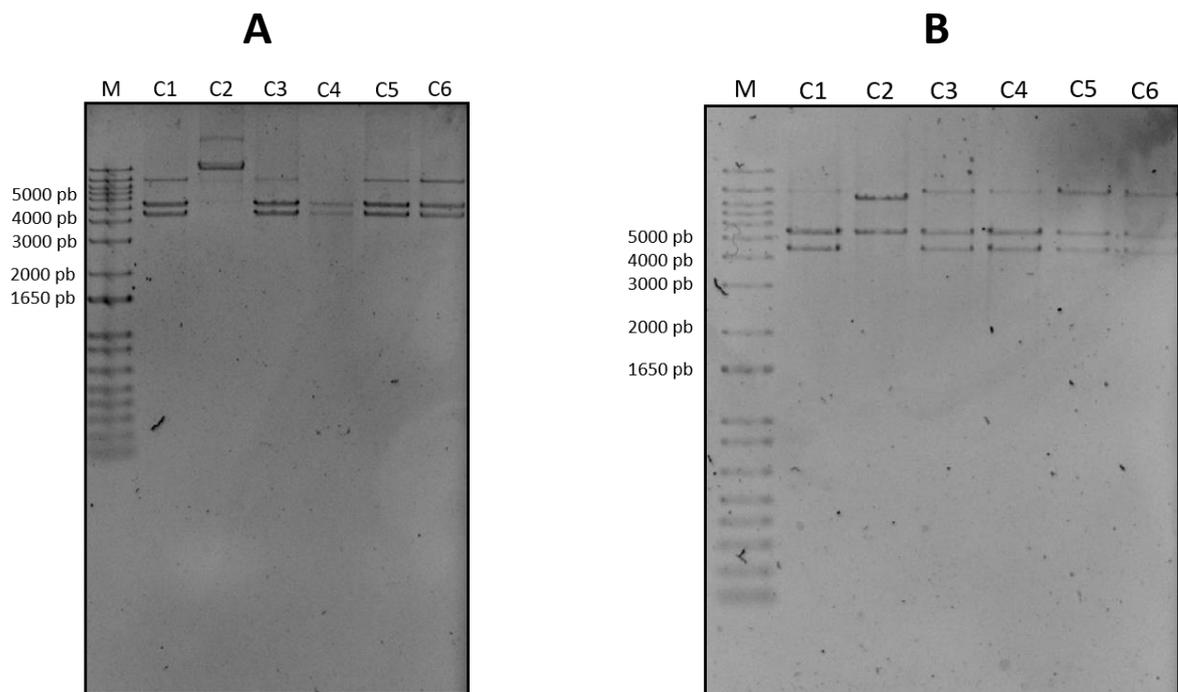


Figura 21: Electroforesis de digestión analítica del pET7 His6-Pentasilk en gel de agarosa al 1%. La calle M representa el Marker 1 kbPlus DNA Ladder. Las calles C1, C2, C3, C4, C5 Y C6 representan las diferentes colonias aisladas seleccionadas para la digestión con XhoI+ XbaI en la imagen A y con NdeI+EcoRI en la imagen B.

A la vista de los resultados positivos obtenidos tras introducir los genes en el plásmido de expresión pET7 RARE, se ha obtenido la siguiente secuencia que verifica la correcta

5.3. BIOPRODUCCIÓN

En este trabajo se ha llevado a cabo la bioproducción del polímero CM₂-Pentasilk TGFβ sintetizado en este mismo laboratorio en estudios anteriores, con un peso molecular de 124241,4 MW. Posteriormente se ha purificado y caracterizado mediante distintas técnicas.

En este proceso en primer lugar debe elegirse la colonia de E. coli que mayor expresión genere. Para ello se introduce el plásmido pET7 CM₂-Pentasilk TGFβ en una cepa bacteriana BLR, una cepa específica de expresión de proteínas empleada en el proceso de producción, es deficiente en algunas proteasas y sistemas de recombinación de DNA de tal forma que estabiliza los productos génicos y proteicos. Se siembra la bacteria sobre una placa Petri de LB agar con el correspondiente antibiótico al cual presenta resistencia (en este caso Ampicilina) y con glucosa que actúa como inhibidor de la expresión, siendo necesaria en este proceso para que se reproduzca la bacteria que contiene el plásmido. Se incuba durante 16-20 horas a 37°C.

Una vez obtenidas las colonias aisladas se seleccionan 8 de ellas y se lleva a cabo una inducción de la expresión del polímero en medio TB para realizar un análisis de producción (punto 4.2.9) Tras su incubación a 37°C durante 16 horas se realiza una electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (punto 4.2.11) para llevar a cabo la selección de la colonia que más produce. Este proceso de selección se realizó una segunda vez eligiendo una colonia que mostraba una mayor producción amplificándola y seleccionando las colonias (doble screening).

El resultado de la electroforesis en gel de acrilamida se muestra en la Figura 22. Las 8 primeras calles representan las colonias seleccionadas. La calle 9 el control negativo de la cepa bacteriana BLR. La calle M el patrón de proteínas.

Observando el screening de las 8 colonias se puede apreciar que la intensidad es similar en varias calles por lo que se considera que la colonia 7 es la que más produce.

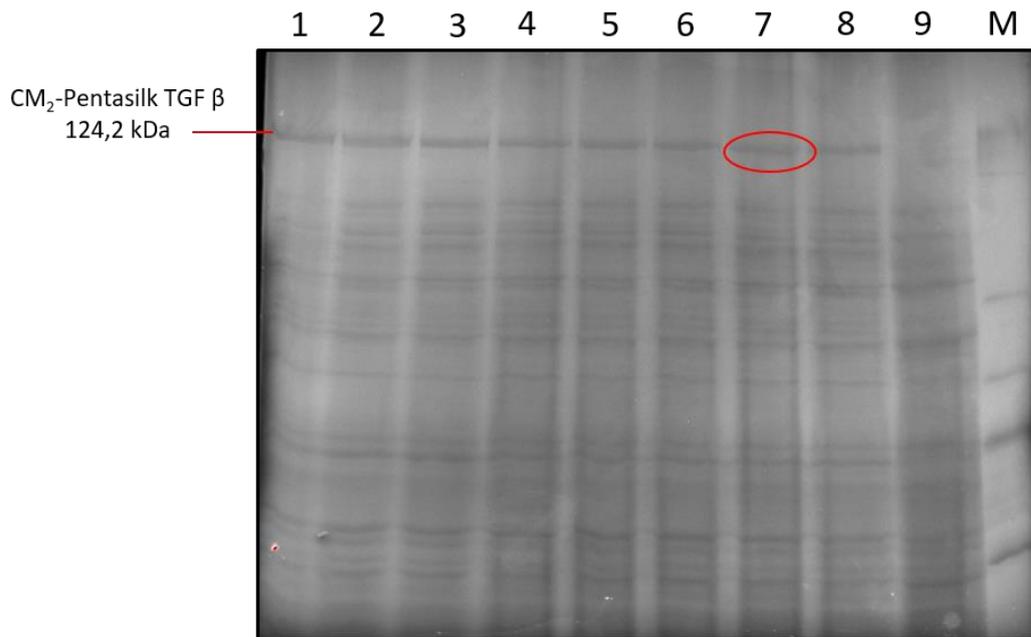


Figura 22: gel de expresión de diferentes colonias bacterianas del polímero CM₂-Pentasilk TGFβ

Una vez seleccionada la colonia que genera mayor expresión se lleva a cabo su inoculación y a continuación se introduce en el fermentador para su producción a gran escala (punto 4.2.9).

Durante el proceso de fermentación se realiza un seguimiento del crecimiento bacteriano mediante electroforesis SDS-PAGE y medidas de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm (punto 4.2.9).

En la Figura 23 se representa el resultado de la electroforesis en gel de acrilamida de diferentes muestras tomadas del fermentador en distintos intervalos de tiempo.

Se observan bandas intensas en las cuatro calles de las muestras a la altura del peso molecular del polímero (124,2 kDa), lo que significa que hay expresión del mismo.

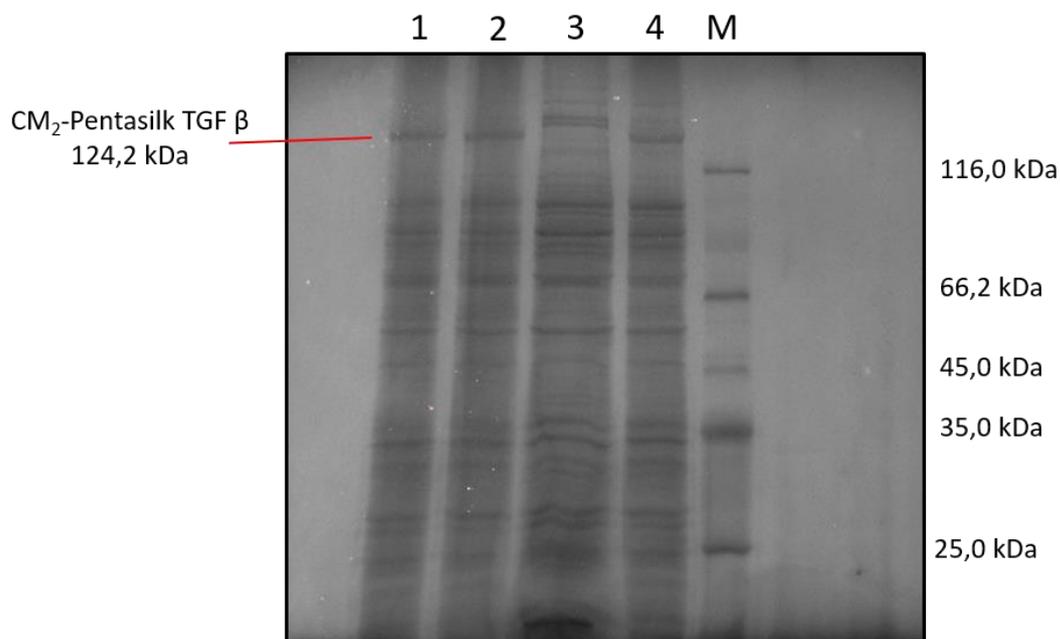


Figura 23: gel de electroforesis del proceso de fermentación de la proteína
 La calle 1 corresponde a la muestra tomada a las 8:00. La calle 2 la muestra de las 8:30. La calle 3 la muestra del inóculo. La calle 4 el control. La calle M el patrón de proteínas.

En la Tabla 5 se representan los valores de los parámetros medidos durante el seguimiento del crecimiento bacteriano.

Hora	pH	T ^a (°C)	%O ₂	rpm	mL OH ⁻	A ⁶⁰⁰	V _{pocillo} (μL)
15:30	6,93/7,10	37	98,2	499	17	-	-
8:00	4,87	37	59,2	499	17	9,054	5,5
8:30	4,99	37	60,3	499	17	8,588	5,8
Inóculo	-	-	-	-	-	0,844	14,81
Control	-	-	-	-	-	7,619	6,6

Tabla 5: Datos correspondientes al seguimiento del crecimiento bacteriano a lo largo de la producción.

Entre la muestra de las 8:00 y las 8:30 se observa disminución en el valor de la absorbancia lo que indica que la fermentación ha llegado a la fase estacionaria y no hay más incremento de biomasa. En ese momento se procede a la recolección celular. A continuación, se lleva a cabo la purificación del polímero (punto 4.2.10).

Por otra parte, para comprobar la existencia de la producción bacteriana del polímero, en las diferentes etapas, se recoge una pequeña cantidad de precipitado y sobrenadante de cada fase de centrifugación y se realiza una electroforesis, cargando en el gel un volumen

de 3 μL para el pellet y 2 μL para el sobrenadante, que supuestamente contiene el polímero, salvo en la última parte del proceso cuando se añade el sulfato amónico (punto 4.2.10).

En la Figura 24 se muestra el resultado de la electroforesis en gel de acrilamida. Se observa existencia de polímero en las calles 2, 4 y 5 que es donde debe aparecer, por lo que se puede confirmar que la purificación es correcta.

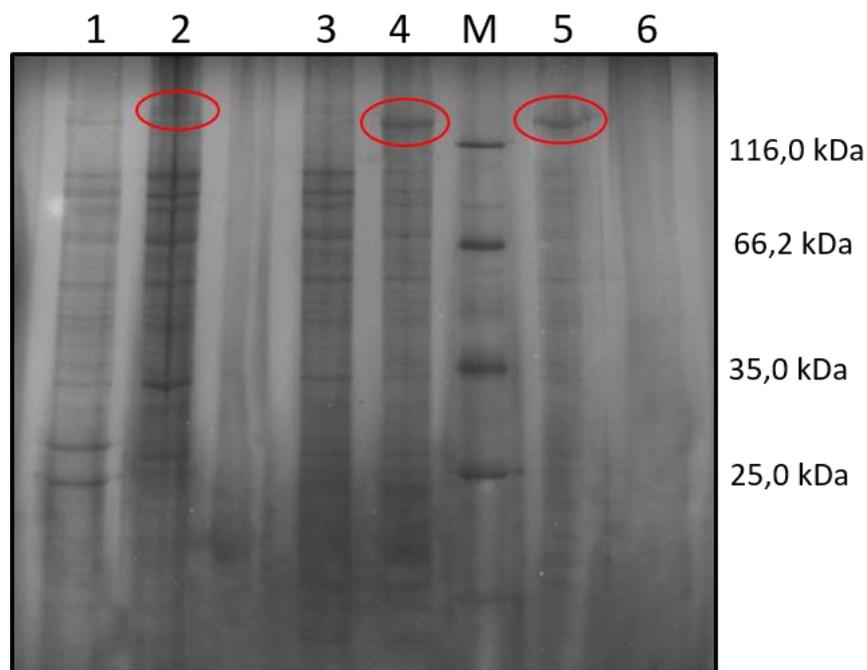


Figura 24: gel de electroforesis de las etapas de purificación de la proteína

Las calles 1 y 2 corresponden a las muestras del pellet del disruptor y sobrenadante respectivamente. Las calles 3 y 4 al pellet y sobrenadante ácidos. La calle M al patrón de proteínas. Las calles 5 y 6 al pellet y sobrenadante del sulfato amónico.

Una vez comprobado que la purificación se ha realizado correctamente se pasa a la etapa de diálisis y se finaliza con la etapa de liofilización (punto 4.2.10), obteniendo así el polímero final puro que se pesa y caracteriza.

A partir de un volumen total de 15 litros utilizados en la fermentación se han obtenido 352,94 miligramos del polímero puro CM₂-Pentasilk TGF β .



Figura 25: polímero CM₂-Pentasilk TGFβ puro obtenido en el proceso de producción.

Con el polímero purificado se ha realizado una electroforesis en gel de acrilamida (Figura 26) con diferentes concentraciones del polímero para comprobar su pureza e integridad. Se ha comparado con una muestra de Pentasilk, cuyo peso molecular es inferior y por tanto su banda debe salir más abajo.

No se observa degradación a lo largo de las calles, por lo tanto la purificación se ha llevado a cabo de forma satisfactoria. Además, se comprueba que el polímero tiene el PM esperado y se compara con el del polímero Pentasilk (calle 5) de menor PM y que por tanto aparece por debajo de las muestras del polímero CM₂-Pentasilk TGFβ bioproducido.

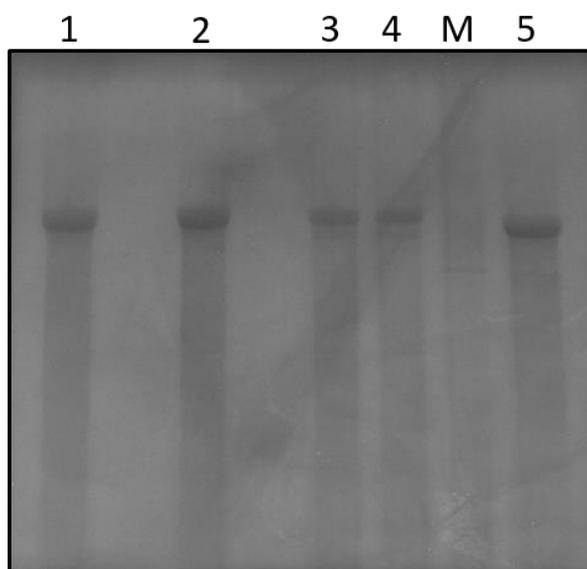


Figura 26: gel de electroforesis a diferentes concentraciones del polímero CM₂-Pentasilk TGFβ. Las calles 1, 2, 3 y 4 corresponden al polímero liofilizado CM₂-Pentasilk TGFβ en concentración decreciente de 4, 3, 2 y 1 mg/mL respectivamente. La calle M es el marcador de proteínas. Y la calle el Pentasilk.

5.4. CARACTERIZACIÓN

La caracterización del polímero puro CM₂-Pentasilk TGFβ se ha llevado a cabo mediante espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR), resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopía de masas (Maldi-TOF) y medidas reológicas.

5.4.1. Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

En primer lugar se realiza un background para estabilizar el sistema. A continuación, se toma una pequeña cantidad de muestra de polímero sólida y se coloca en la celda infrarroja, donde se somete a una fuente de luz infrarroja que realiza un barrido en un rango de longitudes de onda desde 600 a 4000 cm⁻¹.

Esta técnica de caracterización no es cuantitativa, sino que únicamente proporciona información cualitativa. El espectro obtenido se muestra en la Figura 27. Se observan entre 1600 y 1800 cm⁻¹ picos correspondientes a los carbonilos de grupos amida, entre 1000 y 1100 cm⁻¹ la huella dactilar, a 2800 cm⁻¹ grupos CH₂ y CH₃, a 3000 cm⁻¹ los dobles enlaces, y entre 3200 y 3400 cm⁻¹ los grupos NH.

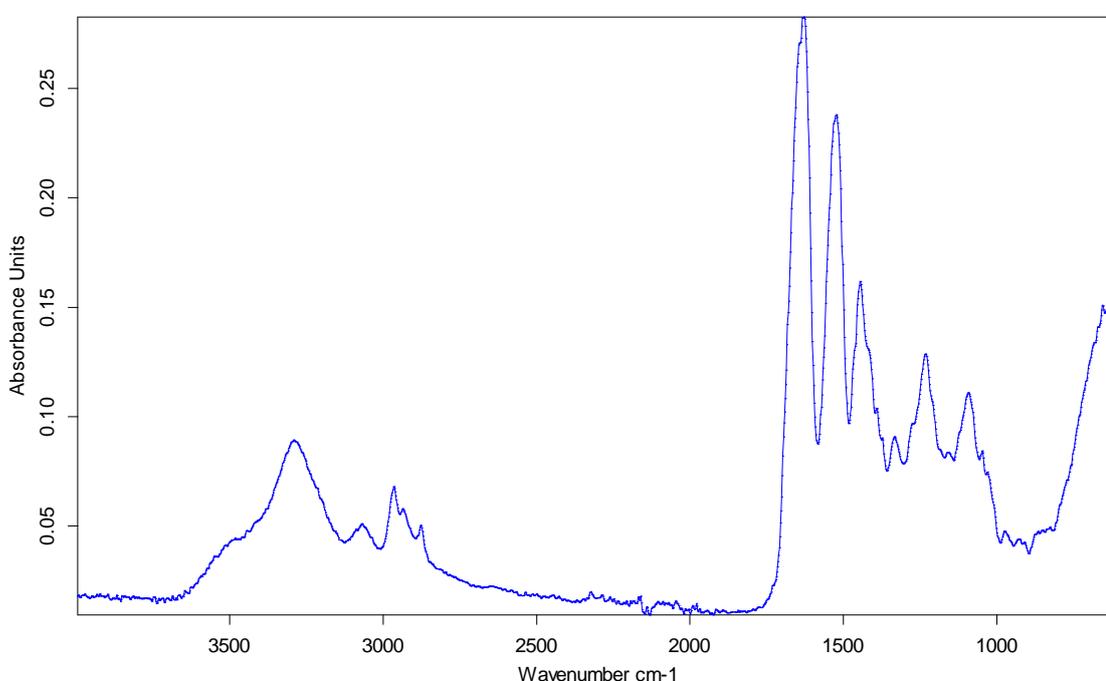


Figura 27: representación gráfica del espectro de infrarrojo del polímero CM₂-Pentasilk TGFβ. Se representa la absorbancia frente al número de onda (cm⁻¹).

5.4.2. Resonancia magnética nuclear (RMN)

Para esta técnica se prepara una disolución de 4 mg de polímero con 0,5-0,6 mL de disolvente DMSO deuterado. Se introduce en un tubo de RMN y se lleva al LTI donde se realiza la medida para obtener el espectro de protón. Este sirve para tener una idea aproximada de la proporción de aminoácidos que componen el polímero. Para comprobar si la señal proporcionada por el espectro de RMN se corresponde con el número de protones que contiene la estructura del polímero es necesario saber en primer lugar el número de grupos funcionales de cada aminoácido mediante un contador de aminoácidos a través de la secuencia completa del polímero. En la siguiente Tabla 6 se recogen dichos valores.

Nº total aminoácidos	CH ₃	CH α	CH	CH ₂	Aromático	NH	OH/SH	Ácidos	Peso molecular
1491	3135	896	496	3324	10	1280	48	28	124242,99

Tabla 6: valores obtenidos del contador de aminoácidos

Obtenidos estos valores se toma como referencia el correspondiente a los metilos (3135) y con él se normaliza el espectro para obtener los valores del resto de las integrales, de tal forma que los valores teóricos deben coincidir o aproximarse a los experimentales.

Se puede observar que a desplazamientos entre 7,5-8,5 ppm se encuentran las señales de H⁺ de los grupos amino (NH). Las señales de los grupos CH₃ se encuentran a desplazamientos entre 0,5-1 ppm. En torno a 4,5 ppm aparecen los grupos aromáticos. Entre 1-1,5 ppm se distinguen tres tipos de señales correspondientes a grupos CH₂. En torno a 4,3 ppm se encuentran los CH α . Alrededor de 2,25 los grupos OH. Por último a 2,5 se encuentra el disolvente DMSO y a 3,2 el agua deuterada del DMSO.

Comparando los valores de las integrales del espectro con los obtenidos a partir del contador de aminoácidos se concluye que se aproximan bastante, lo que significa que tenemos el polímero deseado.

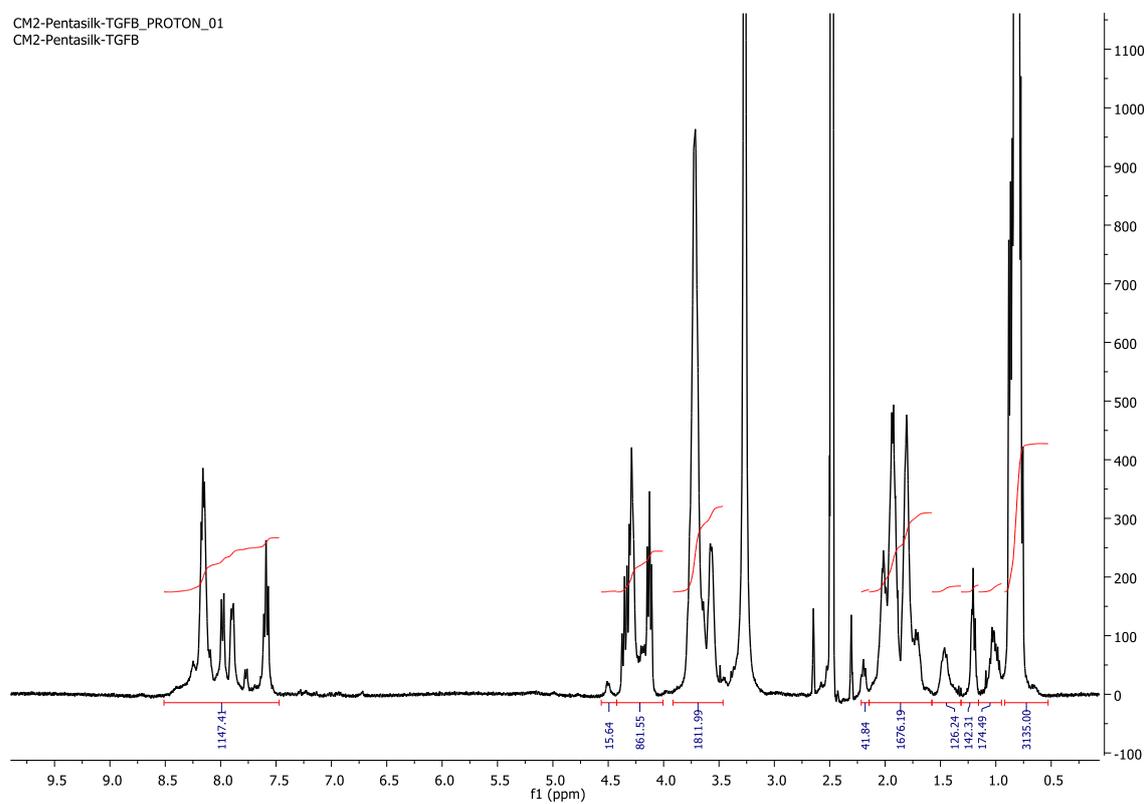


Figura 28: representación gráfica del espectro de RMN de protón del polímero CM₂-Pentasilk TGFB.

5.4.3. Espectroscopía de masas (MALDI-TOF)

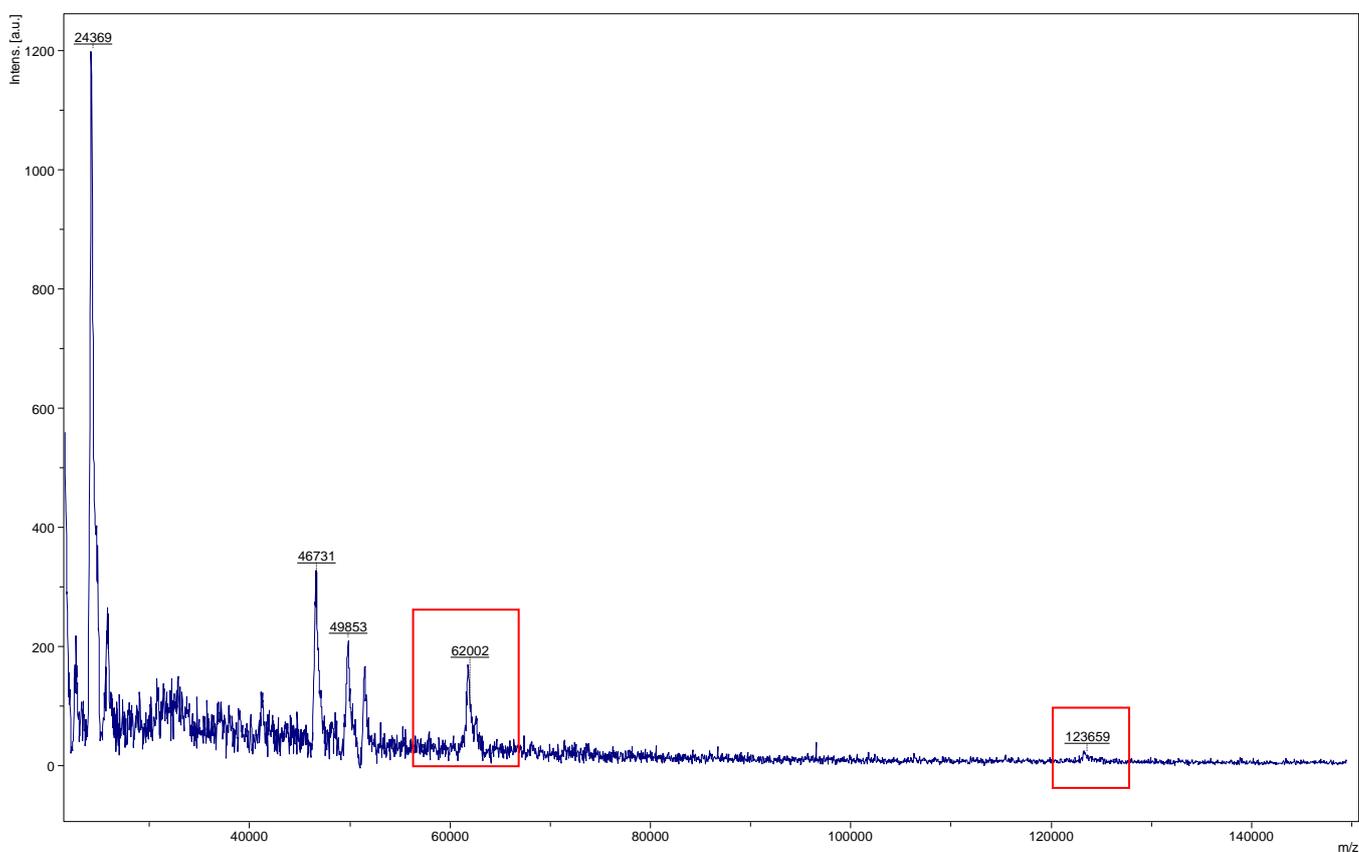


Figura 29: representación gráfica del espectro de masas del polímero CM₂-Pentasilk TGFB.

En la Figura 29 se muestra el espectro de masas del polímero CM₂-Pentasilk TGFβ. Se observa un pico minoritario a 123659 umas que corresponde al peso molecular de la primera ionización del polímero. A continuación, aparece otro pico correspondientes a la segunda ionización del polímero, a 62002, umas. Debido a la complejidad de la técnica en el estudio de compuestos con pesos moleculares tan elevados, no se observan picos más definidos. Los siguientes picos que aparecen pueden ser debidos a degradaciones del polímero durante su bioproducción como se ha comentado anteriormente en los geles de proteínas.

5.4.4. Medidas reológicas

Para cuantificar las propiedades mecánicas las soluciones del polímero, en PBS y glucosa, se han sometido a un estudio reológico. Para ello se comienza colocando las muestras de polímero en disolución entre las placas paralelas del reómetro y se ajusta el espacio entre ellas para evitar el deslizamiento. A continuación, se realizan las correspondientes medidas para determinar las propiedades viscoelásticas mediante diferentes ensayos de deformación, frecuencia y temperatura, para determinar el módulo de almacenamiento (G'), que mide la resistencia a la fuerza, y el módulo de pérdidas (G''), que mide la capacidad del gel para almacenar o perder energía.

A continuación, se muestra la representación gráfica de los resultados obtenidos:

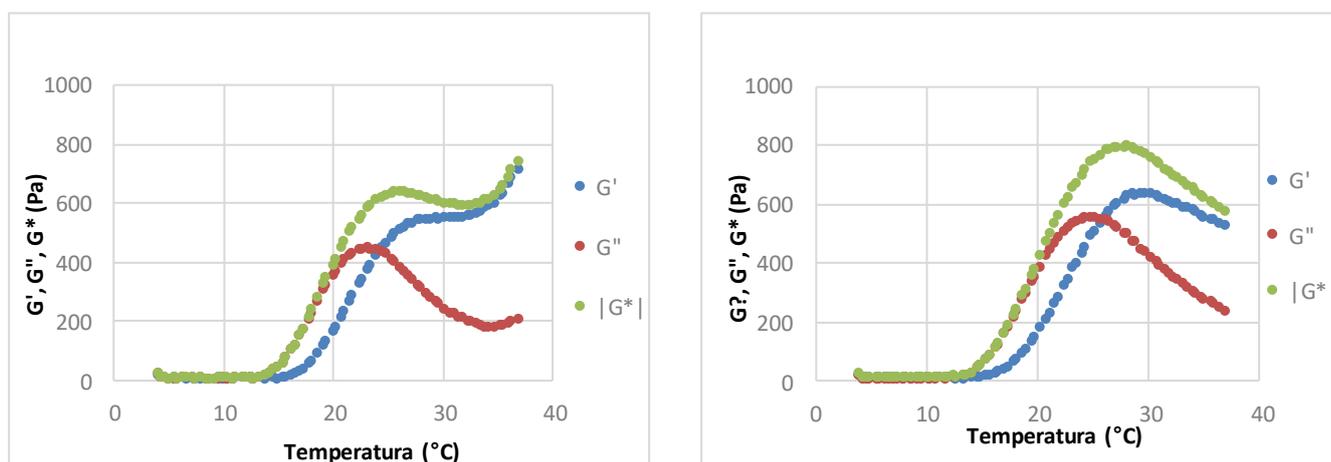


Figura 30: módulos de almacenamiento (G'), pérdidas (G'') y complejo (G^*) para el polímero, disuelto en PBS (izquierda) y glucosa (derecha), en función de la temperatura.

Las muestras se han calentado a 2,5°C/min, 0,2% de strain y una frecuencia de 1Hz en un rango de temperatura de 4 a 37°C. Se observa en ambos casos que a 16°C comienza a gelificar, es decir, el polímero transiciona. A medida que aumenta la temperatura aumenta el módulo elástico debido a la estructura del polímero, sus cadenas pasan de estar disueltas en una conformación estirada (desordenada) a estar plegadas (ordenadas) hidrofóbicamente, y se forma el gel. Alrededor de 30°C se estabiliza. Por tanto las medidas indican que las soluciones experimentan un proceso de gelificación rápido al aumentar su temperatura por encima de su Tt, en un rango de temperatura de 16 a 30°C aproximadamente.

Por otro lado, el comportamiento reológico mostrado por ambas soluciones indica que el rendimiento mecánico, es decir, G' y G'' , es menor cuando está disuelto en PBS que en glucosa.

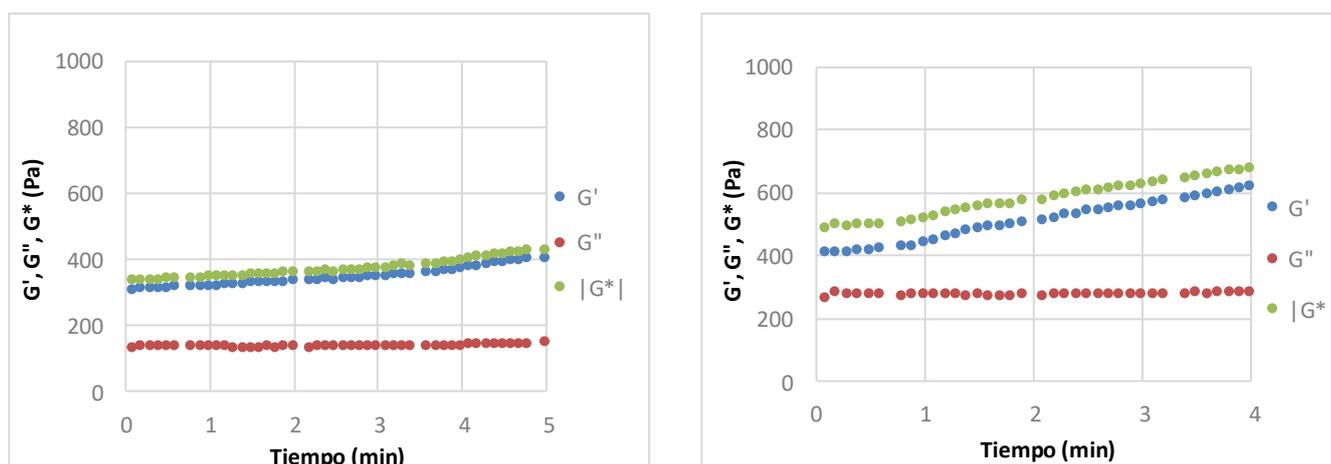


Figura 31: módulos de almacenamiento (G'), pérdidas (G'') y complejo (G^*) para el polímero, disuelto en PBS (izquierda) y glucosa (derecha), en función del tiempo.

El tiempo de gelificación se ha estimado mediante la aplicación de una isoterma a una temperatura constante de 37°C a las dos muestras de polímero. Como se puede observar en la Figura 31 en ambos casos los módulos se mantienen constantes. Se observa un ligero aumento que indica que la muestra se está secando.

El grado de torsión se ha evaluado variando el % de strain a una frecuencia fija de 1 Hz. Se observa en ambos casos que se mantiene constante, presenta un rango lineal, que permite confirmar la garantía de la calidad de las medidas.

Como se puede observar en todas las gráficas mostradas el módulo de almacenamiento es mayor que el módulo de pérdida, lo que indica que el material es elástico.

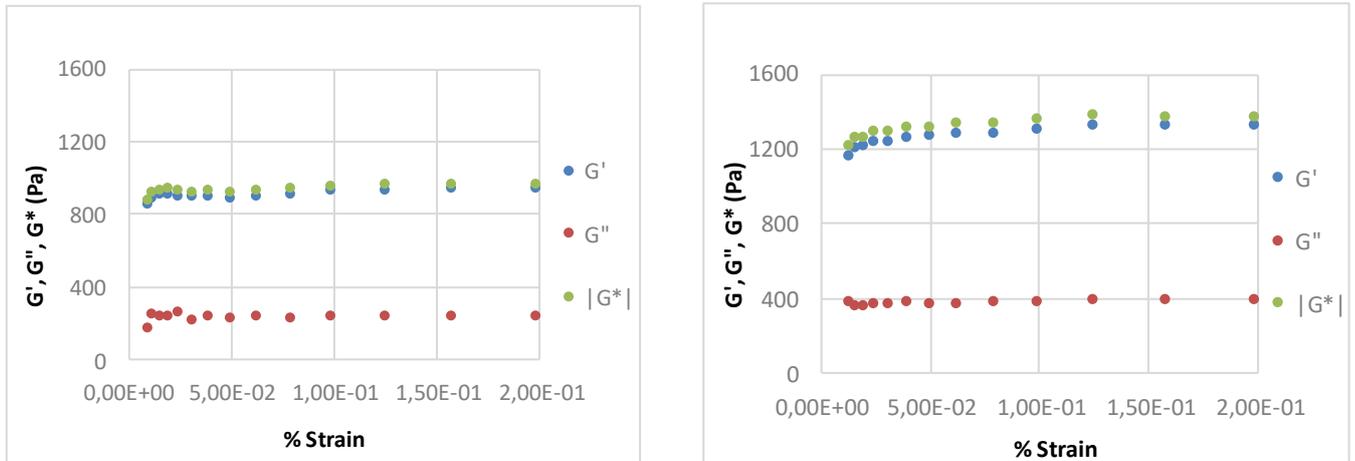


Figura 32: módulos de almacenamiento (G'), pérdidas (G'') y complejo (G^*) para el polímero, disuelto en PBS (izquierda) y glucosa (derecha), en función del % Strain.

Finalmente, tras el estudio de las medidas reológicas dado que las soluciones han sido capaces de formar un gel en un período de tiempo tan corto se puede decir que este polímero es buen candidato para su uso como hidrogel inyectable, ya que un tiempo de gelificación tan corto evitaría fugas tras inyectarse el biomaterial, lo que supone una gran ventaja para su aplicación.

El rendimiento mecánico de los hidrogeles se asemeja al de los tejidos humanos o biológicos, por ello son adecuados como sustratos para imitar el entorno mecánico natural para los estudios de células y para la ingeniería de tejidos, lo que permite su uso en aplicaciones biomédicas.

6. CONCLUSIONES

1. Se ha llevado a cabo la construcción de nuevos genes de ELRs con el fin de obtener nuevos materiales proteicos de tipo elastina para aplicaciones terapéuticas en biomedicina, con capacidad anti-inflamatoria y regenerativa.
2. Los polímeros His6 Tag-Pentasilk-CM₂-C₃Bot y His6 Tag-Pentasilk además están provistos de una secuencia de 6 Histidinas que permite su identificación univoca cuando son implantados en los tejidos del huésped. Para ello se han empleado técnicas de ingeniería genética que han permitido la obtención de sus secuencias. Los dos genes han sido trasladados en un vector de expresión para ser posteriormente producidos y escalados.
3. El ELR His6 Tag-C3Bot-Pentasilk, tras varios intentos realizados con diferentes estrategias seguidas, no se ha conseguido aislar satisfactoriamente para ser introducido en un vector de expresión y poder bioproducirlo. Varios factores y parámetros han intervenido en este resultado, que no obstante han permitido profundizar en la comprensión y solución de los problemas. A nivel de aprendizaje ha supuesto un mayor conocimiento y comprensión de las estrategias y procesos seguidos.
4. Se ha logrado la bioproducción y purificación del polímero CM₂-Pentasilk TGF β sintetizado en este mismo laboratorio en estudios anteriores. El rendimiento para este polímero ha sido inferior a los alcanzados para polímeros muy similares. En estudios posteriores se podría mejorar la producción realizando más ciclos de aislamiento y expansión de las colonias productoras.
5. Se han llevado a cabo diferentes técnicas (SDS-PAGE, FT-IR, RMN, espectroscopía de masas y medidas reológicas) para la caracterización del polímero CM₂-Pentasilk TGF β . Mediante estas técnicas se ha comprobado y confirmado que la bioproducción y purificación del polímero se ha realizado con éxito.
6. El nivel de pureza obtenido es apto para estudiar su posible funcionalidad en aplicaciones biomédicas.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Langer R, Tirrell DA. Designing Materials for Biology and Medicine. *Nature*. 2004; 428: 487-492.
2. Girotti A. Desarrollo de una plataforma biotecnológica para la obtención de polímeros recombinantes tipo elastina. PhD Thesis. 2008.
3. Kikuchi A, Okano T. Nanostructured designs of biomedical materials: Applications of cell sheet engineering to functional regenerative tissues and organs. *Journal of Controlled Release* 2005; 101:69-84.
4. Avila, J. T., De Vera, A. M., Calzadilla, C. H., & Martin Vasallo, P. (1993). Análisis del DNA. II: Clonar, secuenciar y PCR. *Nefrología*, 13, 267-267.
5. Sambrook, J., Fritsch E.F., Maniatis T.; *Molecular cloning, a laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
6. <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-cloning-tutorial/a/overview-dna-cloning>
7. <http://www.cienciahoy.org.ar/ch/hoy08/adn3.htm>
8. Metzenberg, S. Lecture 5: Restriction endonucleases. *Recombinant DNA techniques*. (2002).
9. Gray WR, Sage EH. Evolution of elastin structure. *Adv Exp Med Biol*. 1977; 79:291-312.
10. Mithieux SM, Weiss AS. Elastin. *Fibrous Proteins: Coiled-Coils, Collagen and Elastomers* 2005; 70:437-+.
11. Tan L, Pu Y, Pattathil S, Avci U, Qian J, Arter A, Chen L, Hahn MG, Ragauskas AJ, Kieliszewski MJ. *Changes in cell wall properties coincide with overexpression of extensin fusion proteins in suspension cultured tobacco cells*. *PLoS One*. 2014; 9(12):e115906. Epub 2014 Dec 23.
12. Gray WR, Sandberg LB, Foster JA. Molecular Model for Elastin Structure and Function. *Nature*. 1973; 246(5434): 461-466.
13. Urry DW, Trapane TL, Prasad KU. *Phase-structure transitions of the elastin polypentapeptide-water system within the framework of composition- temperature studies*. *Biopolymers* 1985; 24:2345-2356.
14. 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.

15. Urry DW. *Five axioms for the functional design of peptide-based polymers as molecular machines and materials: Principle for macromolecular assemblies*. Biopolymers 1998; 47:167-178.
16. Urry DW. *Molecular Machines - How Motion and Other Functions of Living Organisms Can Result from Reversible Chemical-Changes*. Angewandte Chemie-International Edition in English 1993; 32:819-841.
17. 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.
18. Fernández-colino, A; Girotti, A; López, MI; Arias, FJ; Rodríguez-Cabello, JC. Los polímeros tipo elastina y su utilización como tags para la purificación de proteínas. Biomecánica, 2011; 19: 8-16
19. <https://www.p psicoactiva.com/blog/plasticidad-neuronal-degeneracion-regeneracion-del-tejido-nervioso/>
20. <https://josefelixrodriguezantonweb.com/tag/neuroregeneracion/>
21. <https://cordis.europa.eu/project/rcn/101196/brief/es>
22. <https://www.tekniker.es/es/biomateriales-avanzados-para-regenerar-el-sistema-nervioso-periferico>
23. Ribeiro A.; Functionality development in systems based on Elastin-like recombinamers: From nano-objects to macrogels. PhD Thesis, 2008.
24. <http://noria.mx/lublearn/espectrometria-infrarroja-por-transformadas-de-fourier/>

8. ABREVIATURAS

C ₃ Bot	C ₃ transferasas de ribosilación de ADP
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FT-IR	Espectroscopía de infrarrojo con Transformada de Fourier
E. coli	Escherichia coli
ELP	Polímero tipo elastina
ELR	Recombináremos tipo elastina
IHC	Inmunohistoquímica
ITC	Ciclo de Transición Inversa
KDa	Kilo Daltons
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
MQ	Agua MilliQ
MW	Molecular Weight
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb o bp	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCC	Pentasilk-CM ₂ -C ₃ Bot
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pDA	pDrive All
PMSF	Fluoruro de fenilsulfonilmetano
RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
SAP	Fosfatasa alcalina de camarón “Shrimp Alkaline Phosphatase”
SDS	Dodecilsulfato sódico
SOC	Super Optimal Catabolite repression
TB	Terri Broth

TE	Eficiencia de Transformación
TEMED	Tetrametiletilendiamina
Tt	Temperatura de transición

Código de representación de bases nitrogenadas

Adenina	A
Guanina	G
Citosina	C
Timina	T
Uracilo	U

Códigos de representación de los aminoácidos

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