



MASTER
EN INVESTIGACION
BIOMÉDICA



Universidad de Valladolid

Síntesis y caracterización de nuevos polímeros recombinantes tipo elastina fusionados a eGFP para la formación de nanopartículas

Máster en Investigación Biomédica

Universidad de Valladolid

BIOFORGE (Biomaterials, Biomimicry and Nanobiotechnology)

Eduardo Pérez del Río

Tutor: Francisco Javier Arias Vallejo

Firma del tutor:

Julio 2015

ÍNDICE

Resumen.....	3
Abstract.....	3
1. Introducción.....	4
1.1. Introducción a la nanociencia y nanotecnología	4
1.2. Materiales basados en proteínas	4
1.3. Polímeros recombinantes tipo elastina	5
1.3.1. Elastina Natural	5
1.3.2. Recombinómeros tipo elastina (ELRs)	5
1.3.3. Diseño de los polímeros recombinantes tipo elastina seleccionados	7
1.3.3.1. Enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP)	7
1.3.3.2. ELRs utilizados en este trabajo	7
1.3.3.3. (EIS) ₂ -eGFP	8
1.3.3.4. (EI) ₂ -eGFP	8
1.3.3.5. PAP (Pokeweed Antiviral Protein)	9
1.3.3.6. RGD.....	9
1.4. Objetivos del trabajo fin de máster	10
2. Materiales y métodos	10
2.1. Materiales.....	10
2.1.1. Reactivos químicos	10
2.1.2. Soluciones tamponadas	10
2.1.3. Materiales biológicos	10
2.1.3.1. Cepas bacterianas	10
2.1.3.2. Medios de cultivo bacteriano	10
2.1.3.3. Enzimas de restricción y modificación de DNA.....	11
2.1.3.4. Vectores plasmídicos	11
2.2. Métodos	12
2.2.1. Producción del polímero recombinante (EI) ₂ -eGFP	12
2.2.1.1. Preparación de placas	12
2.2.1.2. Siembra de placa a partir de stock de glicerol	12
2.2.1.3. Screening de producción	12
2.2.1.4. Pre-inóculo	12
2.2.1.5. Sub cultivo	13
2.2.1.6. Inoculación del (EI) ₂ -eGFP	13
2.2.1.7. Lavado de células	13
2.2.1.8. Lisis de células	13
2.2.1.9. Eliminar desechos celulares	14
2.2.2. Purificación de (EI) ₂ -eGFP	14
2.2.2.1. Centrifugaciones a 4°C y 37°C	14

2.2.2.2.	Diálisis	14
2.2.2.3.	Liofilización	14
2.2.3.	Introducción del gen PAP al plásmido pDrive All.....	15
2.2.3.1.	Subcloning.....	15
2.2.3.2.	Extracción del plásmido pUC57-PAP de la cepa de clonado	15
2.2.3.3.	Digestión preparativa	16
2.2.3.4.	Ligación del gen PAP al plásmido pDrive all	16
2.2.3.5.	Transformación del pD-PAP	16
2.2.4.	Obtención del plásmido con el gen del (EIS) ₂ -PAP	16
2.2.5.	Obtención del plásmido con el gen del polímero RGD-(EIS) ₂ -PAP	16
3.	Resultados y discusión	18
3.1.	Producción del polímero (EI) ₂ -eGFP	18
3.1.1.	Screening para la selección de la colonia a cultivar	18
3.1.2.	Curva de crecimiento.....	18
3.1.3.	Seguimiento de la fluorescencia	19
3.1.4.	Purificación del (EI) ₂ -eGFP	20
3.2.	Caracterización físico-química del polímero	21
3.2.1.	Determinación de la pureza mediante SDS-PAGE	21
3.2.2.	Determinación de la temperatura de transición por Differential Scanning Calorimetry (DSC)	21
3.2.3.	Determinación de la composición por espectroscopia de resonancia magnética nuclear, RMN-H.....	22
3.3.	Caracterización física de nanopartículas. Dynamic Light Scattering (DLS) ...	22
3.3.1.	Nanopartículas formadas por (EI) ₂ -eGFP	22
3.3.2.	Comparación con el polímero (EIS) ₂ -eGFP proporcionado	23
3.3.3.	Nanopartículas de (EIS) ₂ -eGFP disuelto en ácido fórmico	24
3.3.4.	Estudio de la estabilidad con el tiempo de las nanopartículas formadas por (EIS) ₂ -eGFP	25
3.4.	Sustitución de la eGFP por PAP	25
3.4.1.	Extracción del gen PAP mediante digestión preparativa del plásmido pUC57-PAP con la enzima EarI.	26
3.4.2.	Ligación del gen PAP al plásmido pDrive y obtención del pD-PAP linealizado.....	26
3.4.3.	Ligación del pD-PAP a la secuencia que codifica el polímero (EIS) ₂	27
3.4.4.	Obtención del gen RGD-(EIS) ₂ -PAP	27
4.	Conclusiones.....	28
5.	Perspectivas de futuro	29
6.	Agradecimientos.....	29
7.	Referencias	30
8.	Anexo	32

Resumen

Los polímeros recombinantes tipo elastina (ELR) son una de las herramientas bajo investigación en el campo de la nanotecnología y nanociencia, cuyas propiedades tienen muchas aplicaciones en el sector biomédico. Estudios previos sobre esta materia ya han demostrado la capacidad de algunos ELRs anfipáticos para formar nanopartículas (micelas y vesículas) o hidrogeles, y su gran biocompatibilidad. Además, el hecho de que sean recombinantes permite, mediante tecnología de DNA recombinante, la fusión de otras proteínas o péptidos al polímero con la capacidad de auto-ensamblarse, pudiendo así obtener polímeros de fusión con diferentes aplicaciones.

En este trabajo se estudian las propiedades de dos de estos ELR fusionados a la proteína verde fluorescente mejorada (Enhanced Green Fluorescent Protein) eGFP, denominados $(EI)_2$ -eGFP y $(EIS)_2$ -eGFP, con el fin de obtener diferentes nanoestructuras fluorescentes que pudiesen dar lugar cuando se implanta, al seguimiento del tránsito del hidrogel por el organismo mediante diferentes dispositivos de visualización de fluorescencia *in vivo*.

También se inicia un nuevo modelo de polímero de fusión mediante tecnología de DNA recombinante, en el que se fusiona el gen de la proteína PAP, (una proteína inactivadora de ribosomas o RIP), al gen del grupo $(EIS)_2$ ligado al dominio RGD de adhesión celular, obteniendo el polímero RGD- $(EIS)_2$ -PAP. El objetivo de este nuevo polímero es el de otorgar a la proteína PAP un dispositivo a través del cual pueda formar nanopartículas tóxicas asumibles por células cancerígenas.

Abstract

Elastin-like recombinamers (ELR) are one of the tools are under investigation in the field of nanoscience and nanotechnology, which properties have a lot of applications in the biomedical sector. Previous studies in this area have already proved the ability of some amphiphilic ELRs to form nanoparticles (either micelles and vesicles) or hydrogels, of great biocompatibility. Furthermore, the fact that they are recombinamers allows, by DNA recombinant technology, the fusion of other proteins or peptides to the polymer used as backbone with the ability to self-assemble obtaining polymers with different bioactivities and applications.

In this paper the properties of two of these ELR fused to the enhanced green fluorescent protein (eGFP), called $(EI)_2$ -eGFP and $(EIS)_2$ -eGFP, are studied. The objective is to obtain different fluorescent nanostructures which could be implanted and which transit through the body could be monitored by different fluorescence *in vivo* imaging devices.

Besides, a new model of fusion polymer was designed by recombinant DNA technology, in which the PAP protein's gen (a ribosome inactivating protein, or, RIP) is fused with the gen of the group $(EIS)_2$ linked to the domain RGD of cell adhesion, obtaining the polymer RGD- $(EIS)_2$ -PAP. The objective of this new polymer is to confer the PAP protein a device through which toxic nanoparticles could be formed, so the PAP protein could be internalized by cancer cells.

1. Introducción

1.1. Introducción a la nanociencia y nanotecnología

Los estudios en las áreas de la nanociencia y nanotecnología han cobrado mucha importancia y desarrollo en los últimos años. La investigación en este campo promete aplicaciones tan espectaculares como nanopartículas para llevar fármacos de forma específica a su sitio de acción, o nuevos materiales capaces de imitar a la matriz extracelular (ECM), y comunicarse con las células, para, por ejemplo inducir la regeneración de los tejidos. Este área está siendo muy investigada actualmente, tanto por científicos como en el campo industrial [1].

La liberación controlada de fármacos es uno de los campos que han sido mejorados gracias a estas investigaciones, cuyo objetivo es conseguir medicamentos que actúen sólo en su sitio de acción, ya que cuanto más focalizado es el tratamiento, más efectivo es menos efectos secundarios produce [1]. Se están ofreciendo métodos para mejorar tanto las características de difusión del fármaco como las de degradación del material encapsulante, permitiendo que el fármaco se transporte de forma mucho más eficaz y que su liberación sea igualmente más controlada [2].

La formulación de fármacos en forma nanoestructurada aumenta su solubilidad y eficacia, permitiendo utilizar rutas de administración más efectivas (oral, trascutánea y pulmonar) y alcanzar localizaciones en el cuerpo que tradicionalmente han sido difíciles, como el cerebro [2].

Las nanopartículas que se utilizan para este propósito son sintetizadas a partir de materiales orgánicos (lípidos, polímeros, liposomas...) aunque también se están desarrollando nanotransportadores inorgánicos (partículas magnéticas, puntos cuánticos de semiconductor, oro coloidal y nanopartículas de fosfato cálcico).

1.2. Materiales basados en proteínas

Los materiales basados en proteínas han llamado la atención de numerosos investigadores en los últimos años como biomateriales avanzados prometedores para su uso en el campo de la biomedicina, debido al desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular e ingeniería genética que permiten su producción recombinante de una manera extremadamente controlada y versátil [3], que permite diseñar y fabricar materiales explotando las características de proteínas naturales.

Existen algunas características que deben presentar este tipo de materiales para poder ser utilizados como implantes en el organismo humano, por ejemplo, los materiales y sus sub-productos no deben ser mutagénicos, carcinogénicos, antigénicos, tóxicos y, lógicamente deben ser antisépticos, esterilizables, compatibles con el tejido receptor, de fácil procesado y capaz de conformarse en distintas formas entre otros requisitos. Hoy en día, una gran parte de la investigación en el área de los polímeros para aplicaciones biomédicas se encuentra dirigida sobre todo al desarrollo de polímeros sintéticos [4].

Algunos de los materiales derivados de proteínas más estudiadas son los denominados recombinámeros tipo elastina, Elastin Like Recombinamers (ELR), en

sustitución de la terminología más convencional, polímeros tipo elastina, Elastin-Like polymes (ELPs), que se refieren a los primeros materiales creados a través de una síntesis química [5].

1.3. Polímeros recombinantes tipo elastina

1.3.1. Elastina Natural

La **elastina** es uno de los componentes proteicos más importantes de la matriz extracelular, siendo su función biológica aportar elasticidad a los tejidos, además de modular el comportamiento celular y promover la reparación tisular. Se trata de un polímero con un peso molecular de 70 kDa con gran capacidad de expansión [6].

Está formada por una cadena de aminoácidos con dos regiones: una hidrofóbica y otra hidrofílica, formando estructuras de tipo hélice alfa. La región hidrofóbica es la que confiere la elasticidad característica a la elastina [6].

Esta proteína contiene en su secuencia aminoacídica regiones gobernadas por motivos repetidos como VPGG, VPGVG, APGVG, y, VGVAPG, gracias a los cuales puede sufrir grandes deformaciones sin ruptura y recuperar su conformación original al desaparecer dicho estrés. Además este proceso se caracteriza por ocurrir sin pérdida energética, lo que permite que las fibras de elastina sufran numerosos ciclos de relajación-extensión sin sufrir daño alguno [7].

Las excelentes propiedades de la elastina natural han impulsado el desarrollo de versiones recombinantes de este polímero a base de proteínas y han dado lugar a los llamados recombinámeros tipo elastina (ELRs), basados en las secuencias que se encuentran repetidas en la elastina natural [9].

1.3.2. Recombinámeros tipo elastina (ELRs)

Los polímeros recombinámeros basados en elastina (ELR) son una de las herramientas bajo investigación del campo de la nanociencia y la nanotecnología, cuyas propiedades, como el autoensamblaje en respuesta a diferentes estímulos como la temperatura, tienen muchas aplicaciones en el sector biomédico.

Todos los ELRs funcionales presentan una transición de fase reversible en respuesta a cambios en la temperatura. La temperatura a la que se produce este cambio de fase se denomina **temperatura de transición (T_t)** [5]. Por debajo de esta T_t las cadenas de polímero permanecen libres y extendidas en forma de bobinas aleatorias que están hidratadas. Esta hidratación hidrófoba se caracteriza por una estructura de agua-clatrato como se muestra en la parte izquierda de la Fig. 1. Cuando la temperatura supera la T_t la cadena pierde las moléculas de agua, plegándose para adoptar una estructura regular conocida como espiral- β , que se estabiliza mediante contactos hidrófobos (parte derecha de la Fig. 1). Esta transición conformacional es lo que conlleva una transición de soluble a insoluble en un disolvente acuoso, debido a la ruptura de las jaulas de clatrato y a las interacciones hidrofóbicas. Este plegado es completamente reversible en la reducción de la temperatura de la muestra por debajo de la T_t , cuyo valor depende de la masa molecular, la polaridad media del polímero, y la presencia de otros iones y moléculas [8].

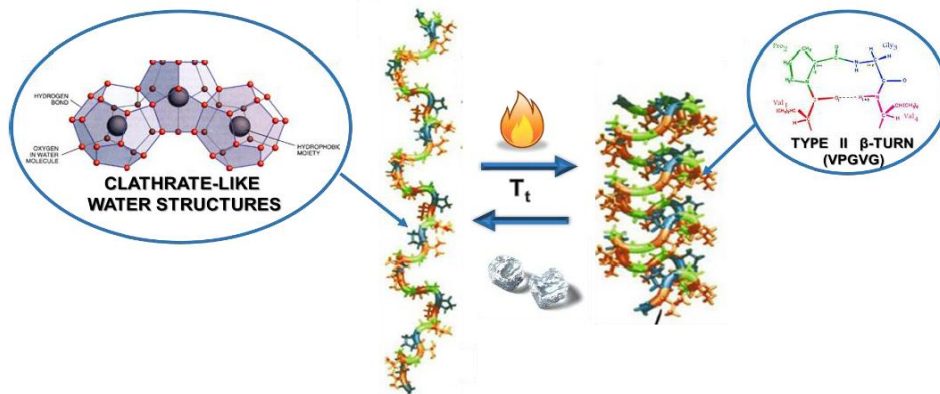


Fig. 1. Representación esquemática del cambio de estructura que sufren los ELRs por encima y por debajo de su temperatura de transición (T_t)

Estudios previos sobre esta materia ya han demostrado la capacidad de algunos ELRs anfífilos para formar nanopartículas (micelas y vesículas) o hidrogeles, dependiendo de la concentración de polímero (alta o baja, respectivamente), y su gran biocompatibilidad. En la fig. 2 se muestra un resumen de las diferentes estructuras que los sistemas basados en ELRs pueden adoptar para su uso en aplicaciones biomédicas. Además, el hecho de que sean recombinámeros permite, mediante tecnología de DNA recombinante, la fusión de otras proteínas o péptidos al polímero usado como base con la capacidad de auto-ensamblarse, pudiendo así obtener polímeros de fusión con diferentes aplicaciones.

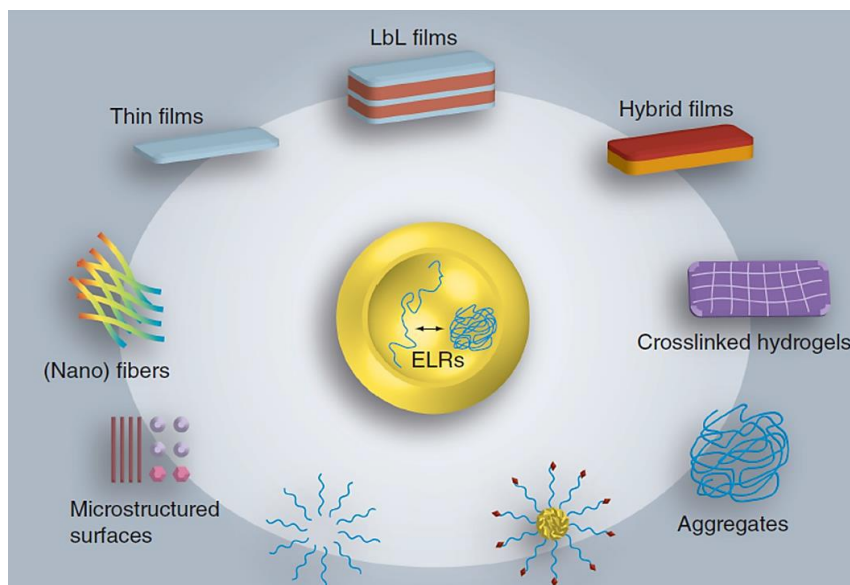


Fig. 2 Diferentes estructuras que los sistemas de ELRs pueden adoptar

Estas propiedades hacen que estos polímeros tengan el potencial para muchas aplicaciones biomédicas, como en la ingeniería de tejidos, ingeniería de superficies, la administración de fármacos y la generación de nano-dispositivos [8].

1.3.3. Diseño de los polímeros recombinantes tipo elastina seleccionados

1.3.3.1. Enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP)

La proteína verde fluorescente, o, GFP, es una molécula reportera excelente clonada a partir de la medusa *Aequorea victoria*. Esta proteína es de gran interés científico en el campo de la biología molecular debido a sus propiedades únicas de fluorescencia, capaz de emitir fluorescencia intensa y estable sin la presencia de ningún cofactor y en una muy amplia gama de condiciones (pH, temperatura, sales) [12]. A partir de ingeniería genética las propiedades fluorescentes de la GFP original se han mejorado aún más, dando como resultado a la que actualmente se denomina eGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) con un espectro de excitación desplazada al rojo (480-500nm) y una fluorescencia emitida aún más brillante (507-511nm) [10]. La masa molecular de esta proteína es de 27kDa

La GFP tiene una estructura de barril- β de 11 hebras roscado por una hélice- α corriendo el eje del cilindro, como se muestra en la figura 3. El cromóforo está unido a la hélice- α , situándose casi perfectamente en el centro del cilindro. Casi toda la secuencia primaria se utiliza para construir la estructura de barril- β y la hélice axial, de modo que no hay lugares obvios donde se puedan producir grandes deleciones y reducir el tamaño de la proteína por una fracción significativa.

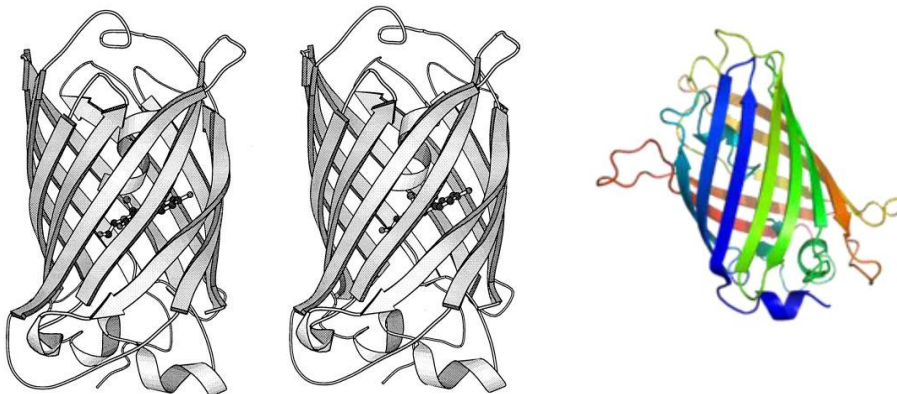


Fig. 3. Diferentes vistas de la estructura terciaria de la proteína GFP. Código expasy 1ema

En este caso esta proteína se estudia con el propósito de, a través de estrategias nanotecnológicas, incluir la eGFP en sistema de administración de fármacos o dispositivo biomédicos para permitir el seguimiento de los materiales a través de un organismo. En este caso se eligió la versión mutante eGFP para la fusión a un ELR con el fin de lograr una gran intensidad de fluorescencia de excitación a 488 nm [4].

1.3.3.2. ELRs utilizados en este trabajo

(EI)₂

Su secuencia de aminoácidos es: MESLLP- $\{[(VPGVG)-2-(VPGEG)-(VPGVG)]_{10} [VGIPG]_{60}\}_2-V$ (previamente sintetizada en laboratorio). Los grupos E50 e I60 del polímero están referidos al bloque hidrofílico, bloque E, denominado así por la sustitución de la isoleucina (I) del pentapéptido elastomérico VPGIG por un glutámico (GLu, E); y al bloque hidrofóbico (bloque I) con la isoleucina original. Este polímero se auto-ensambla y formar nanopartículas a bajas concentraciones e hidrogeles a altas concentraciones de forma reversible. Su masa molecular es de 93.1kDa [13].

(EIS)₂

El grupo *Silk* (S), de este polímero es un grupo proveniente de la proteína de la seda, cuyo motivo de repetición es el grupo [GAGAGS], presente en la seda del gusano de seda *Bombyx mori*. Esta proteína es insoluble por sí misma, pero cuando se combina con un recombinámero de tipo elastina (SELRs), como en este caso, se obtiene un polímero soluble en disolventes acuosos a bajas temperaturas [16].

La secuencia de aminoácidos del copolímero resultante es: MESLLP- $\{[(VPGVG)_2-(VPGEG)-(VPGVG)_2]_{10} [VGIPG]_{60}-[V(GAGAGS)5G]_2\}_2$ -V (previamente sintetizada en laboratorio). Este polímero es capaz de auto-ensamblarse y formar nanopartículas a bajas concentraciones e hidrogeles a altas concentraciones de una estabilidad muy fuerte y de forma irreversible, ya que, aunque las transiciones en los ELRs son reversibles cuando se modifican factores como la temperatura, en el caso de los SELR son irreversibles debido a las altas interacciones hidrofóbicas entre los motivos *Silk* que conducen a la cristalización [13]. La masa molecular de este polímero es de 101.12kDa.

1.3.3.3. (EIS)₂-eGFP

Este polímero fue proporcionado por Arturo Fonseca, miembro del grupo de investigación BIOFORGE. En este caso la proteína eGFP se fusionó al polímero (EIS)₂, como se muestra en la primera representación esquemática de la figura 5. Tiene una masa molecular de 127 kDa.

1.3.3.4. (EI)₂-eGFP

Este otro polímero es similar al descrito anteriormente sólo que sin la presencia del grupo *Silk* proveniente de la seda. En este caso la eGFP se ha unido a un ELR anfipático que está formado solo por dos bloques hidrofílicos (bloque E), y dos hidrofóbico (bloque I). Se muestra un esquema de su estructura en la segunda imagen de la figura 4. Este fue el polímero cuya producción se llevo a cabo en este trabajo. Su masa molecular es de 120 kDa.

En este caso se obtiene un polímero tetrabloque con la misma capacidad para auto-ensamblarse y formar nanopartículas, solo que el tamaño de estas partículas y su estabilidad serán menores, además sus transiciones serán reversibles debido a la ausencia del grupo *Silk*.

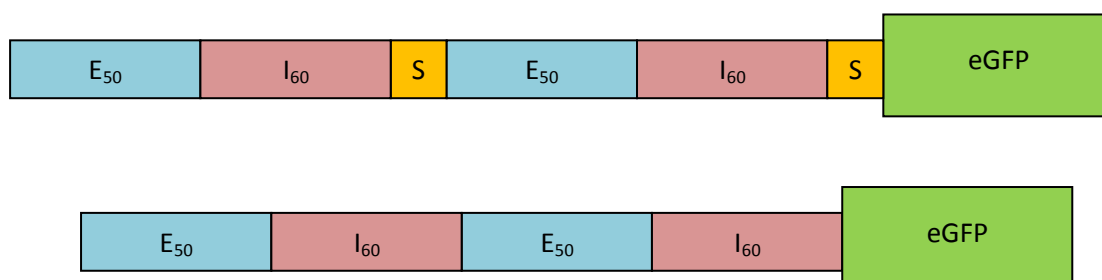


Fig. 4. Esquema estructural de los polímeros (EIS)₂-eGFP y (EI)₂-eGFP respectivamente

1.3.3.5. PAP (*Pokeweed Antiviral Protein*)

La proteína denominada PAP, del inglés pokeweed antiviral protein (proteína antiviral de hierba carmín) es una proteína inactivadora de ribosomas (RIP) de tipo I proveniente de la planta *P. americana*, de un tamaño de 29kDa, que actúa como una proteína antiviral previniendo la replicación de varios virus [19]. Esta proteína actúa de forma selectiva, depurinando sólo los ribosomas de las células invadidas por virus, previniendo la reproducción del virus y su propagación, por lo que las células que no han sido infectadas no son afectadas [20]. Esta proteína se está investigando para la inhibición de la multiplicación del virus del herpes simple, para el virus del SIDA y tratamientos para la leucemia infantil [21]. El gen de esta proteína se optimizó para *E. coli*, del cual se obtiene esta proteína con la estructura espacial que se muestra en la fig. 5.



Fig. 5. Estructura terciaria de la proteína PAP. Código expasy PDB 1J1Q

1.3.3.6. RGD

Las proteínas que contienen el sitio de unión Arg-Gly-Asp (RGD), junto con las integrinas que sirven como receptores de este sitio de unión, constituyen un sistema de reconocimiento muy común en adhesión celular. Casi la mitad de los más de 20 integrinas conocidas reconocen esta secuencia en por sus ligandos de adhesión. La unión a estas integrinas puede ser reproducida por pequeñas secuencias de péptidos sintéticos que contengan la secuencia RGD, promoviendo la adhesión celular.

Mediante ciclación de péptidos con secuencias concretas del dominio RGD se pueden diseñar reactivos que se unan de forma selectiva a una o varias de las integrinas que reconocen el dominio RGD. Esto también se puede realizar mediante síntesis de dominios que imiten al RGD. El diseño de fármacos basado en la estructura RGD puede proporcionar nuevos tratamientos para enfermedades tales como trombosis, osteoporosis y cáncer [22].

Se ha demostrado que la co-administración en conjunto con el dominio RGD aumenta la extravasación del tumor de múltiples tipos de agentes terapéuticos, incluyendo fármacos de moléculas pequeñas (por ejemplo, doxorubicina), anticuerpo utilizados como fármacos (como el trastuzumab) y nanopartículas terapéuticas (nab-paclitaxel) [23].

1.4. Objetivos del trabajo fin de máster

El propósito global de este trabajo es la producción de nuevos polímeros recombinantes tipo elastina y el estudio de su capacidad para la formación de nanopartículas. Para ello se realizó la siguiente lista de objetivos a llevar a cabo:

- Producción y caracterización físico-química del polímero (EI)₂-eGFP
- Caracterización física de las nanopartículas formadas por el polímero (EI)₂-eGFP producido, y por el polímero (EIS)₂-eGFP proporcionado para su comparación.
- Elección del polímero más adecuado para generar partículas estables.
- Sustitución de la ligación con eGFP del polímero elegido por una ligación a la proteína PAP.
- Síntesis del gen del polímero seleccionado ligado al dominio de adhesión celular RGD, y la proteína PAP, para poder llevar a cabo la producción de un nuevo polímero.

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales

2.1.1. Reactivos químicos

La tabla que contiene todos los reactivos químicos utilizados a lo largo del proyecto junto a sus casa comerciales se encuentra en la tabla 1 del Anexo.

2.1.2. Soluciones tamponadas

Los tampones utilizados en los experimentos realizados en este proyecto fueron:

- PBS: 5mM Na₂HPO₄ pH 7.4, NaCl 140mM.
- TAE: 1mM EDTA pH 8, 40mM Tris-acetato.
- Tampón de electroforesis: 25mM Tris-base pH 8.3, glicina 192mM y SDS 0.1% (p/v).
- TBS (tampón de lavado): 20mM Tris-base pH 8, 140mM NaCl.
- TE (tampón de sonicación): 10mM Tris-base pH 8, 1mM EDTA, 1mM PMSF.

2.1.3. Materiales biológicos

2.1.3.1. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas de *Escherichia coli* utilizadas como sistema heterólogo de expresión fueron: XL-1 Blue Competent Cells para las ligaciones, y XL-1 Blue Subcloning Grade Competent Cells para los subclonajes.

2.1.3.2. Medios de cultivo bacteriano

Se van a los siguientes tipos de medio de cultivo para la producción de cepas bacterianas:

- **Medio LB:** Este es un medio que se utiliza para el crecimiento de las bacterias pero que no provoca la sobreexpresión de la proteína. Para su preparación se deben disolver 25g de medio por litro de agua destilada, suplementado con glucosa al 1% y con el antibiótico correspondiente, en este caso, Ampicilina.
- **Medio TB:** El medio TB es un medio que contiene lactosa, lo cual induce la expresión de la proteína de interés. Para la preparación de medio TB se requieren 55.55g por litro de agua destilada. Además necesita glicerol como complemento a una concentración de 8mL/L.
- **Medio de Agar+LB:** Este es el medio que se usa para la preparación de las placas de cultivo. Se necesita medio LB, de nuevo 25g/L, y 15g/L de agar.

Una vez preparados estos medios se meten las botellas donde se les someterá a 120°C durante 20 minutos.

- **SOC I:** Este medio se utiliza para la transformación bacteriana.

2.1.3.3. Enzimas de restricción y modificación de DNA

Las enzimas de restricción que se han empleado en este proyecto han sido: *Eco* RI, *Dpn* I, *Ear* I, y *Sap* I. Además de las enzimas de restricción también se usaron la *T4* DNA ligasa (Thermo Scientific) como ligasa, y la *FastAP* y *SAP* para defosforilar los plásmidos.

2.1.3.4. Vectores plasmídicos

El vector utilizado para la clonación fue el vector de clonación pDrive All, mutado por el grupo BIOFORGE, de forma que tiene un único sitio de reconocimiento para la *Sap* I en el extremo 5', y dos sitios de reconocimiento por *Ear* I flanqueando la región de clonaje. Su mapa génico se muestra en la figura 6.

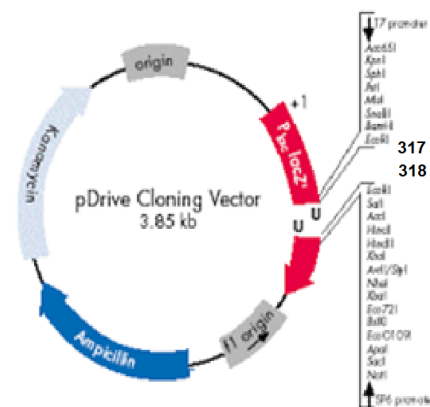


Fig. 6. Esquema del vector de clonación pDrive.

En este esquema se indican los principales dominios funcionales del plásmido comercial y la región de policlonaaje (317-318) en la que se introduce un sitio *Sap* I y dos sitios *Ear* I.

2.2. Métodos

2.2.1. Producción del polímero recombinante (EI)₂-eGFP

La producción de este polímero parte de una construcción génica previa donde el gen del (EI)₂-eGFP se encuentra en un plásmido de expresión introducido en una cepa de *E. coli*. Este stock fue proporcionado por Arturo Ibáñez Fonseca, miembro del grupo de investigación BIOFORGE.

2.2.1.1. Preparación de placas

Al medio de Agar+LB antes preparado es a partir del cual se hacen las placas. A este se le añade ampicilina, que está al 1000x; y glucosa, de la cual se requieren 10mg glucosa/mL. Las placas se rellenan y se dejan solidificar dentro de la campana de flujo laminar, tras lo cual se almacenan en el frigorífico.

2.2.1.2. Siembra de placa a partir de stock de glicerol

Se toma una de las placas de LB+Agar preparadas. Del congelador a -80°C se extraen las cepas en stock que vayan a ser sembradas y se colocan en un baño de hielo. En este caso se sembró una cepa modificada para la sobreexpresión del polímero (EI)₂-eGFP, mediante siembra por estría. Tras esto se lleva a la estufa a 37°C hasta que se observen colonias aisladas, que suele tratarse de unas 16-21h.

Una vez crecidas las colonias aisladas, se seleccionan bajo campana 8 de ellas, se pinchan a un falcon con 5ml de medio TB, suplementado con el antibiótico ampicilina. Estos falcon se llevan al incubador, en el cual se dejan crecer durante 16-21h a 37°C, con agitación orbital (250rpm). En este punto, el medio debería aparecer turbio, indicando crecimiento bacteriano.

2.2.1.3. Screening de producción

Una vez crecidas las 8 colonias aisladas tomadas se prepara un gel de acrilamida al 10% para elegir qué colonia se va a seleccionar para la producción del recombinámero de tipo elastina, en este caso, (EI)₂-eGFP. En el anexo se muestran las cantidades optimizadas para hacer un gel tanto del 10% como a otros porcentajes (tabla 2).

Tras hacer la electroforesis el gel se tiñe en una solución de cloruro de cobre 0.3M durante unos 10 minutos a temperatura ambiente en un agitador de balanceo, tras lo cual se destiñe parcialmente en agua destilada. Teñido el gel se elige una colonia atendiendo al nivel de expresión, principalmente, aunque podría tenerse en cuenta otros factores como el nivel de degradación, la presencia de proteínas no deseadas, etc. El resultado del screening se muestra en la figura 9 del apartado resultados. A partir de la colonia elegida se sembró por estría una nueva placa de LB+Agar para preparar un pre-inóculo.

2.2.1.4. Pre-inóculo

Se necesitan 5mL de LB por pre-inóculo a los que se le añade 500 µL de glucosa estéril al 20% (se necesitan 50 µL de glucosa por mL) y 10 µL de Ampicilina 1000x, ya que se requiere 1 µL de Ampicilina por mL. Tras añadir todo esto a un falcon de 15mL se pincha y se introduce en él la colonia elegida llevando este al incubador para que crezca.

2.2.1.5. Sub cultivo

A partir del pre-inóculo se prepara el sub cultivo, para ello se añaden a un matraz de 250mL 30mL de LB, 1500 µL de glucosa, y 30 µL de Ampicilina. A este matraz se le añade el pre-inóculo y se lleva al incubador, donde se mantiene entre 4 y 5 horas.

2.2.1.6. Inoculación del (EI)₂-eGFP

Para este paso se toman los recipientes con medio TB salidos del autoclave y se les añade 1mL de ampicilina por cada 2 litros de medio. El medio TB suplementado con el antibiótico se reparte entre varios erlenmeyer, con deflectores para una mejor oxigenación del medio. A cada erlenmeyer se le añade 1mL del inóculo. Estos se llevan a los incubadores de agitación orbital donde permanecerán creciendo entre 16 y 20 horas a 37°C, y 250rpm de agitación. Midiendo la absorbancia se puede llevar un control de este proceso (en la fig. 10 de la sección de resultados se muestra la curva de crecimiento obtenida). La producción se detiene cuando se observa que en un intervalo de tiempo los valores de absorbancia medidos no cambian.

2.2.1.7. Lavado de células

La primera centrifugación para que las células precipiten se hará durante 15 minutos a una velocidad de 4200rpm en una centrífuga Sorvall RC12BP, rotor H-12000_{#77050}, por lo que la producción de los erlenmeyer se pasa a los recipientes correspondientes a esta centrífuga, siempre equilibrándolos antes. Una vez se han pegado las células se desecha el sobrenadante por el fregadero, colocando antes una pastilla de cloro en el sumidero.

El pellet resultante se resuspende en buffer de lavado, y se lleva a centrifugar de nuevo a la misma centrífuga a 4200rpm durante otros 15 minutos. Tras este segundo lavado se desecha el sobrenadante, y según como de claro salga éste se decide si deben hacer más fases de lavado o no.

2.2.1.8. Lisis de células

Hay varias maneras de romper las células, en este caso se va a explicar la ruptura en el sonicador, y en el disruptor. Antes de utilizar cualquiera de estos métodos primero se debe resuspender el pellet resultante del último ciclo de lavado en tampón de sonicación y añadir los inhibidores correspondientes, en este caso, PMSF, EDTA, E64, Leupeptin, Pepstatin A, y AEBSF. Sus especificaciones se encuentran en la tabla 3 del anexo. Una vez añadidos los inhibidores se lleva al sonicador o al disruptor.

Sonicador

Para esta aplicación, se utilizan pulsos de 2 segundos de duración y un intervalo entre impulsos de 3 segundos en un sonicador 'Misonix sonicador 3000'. El tiempo de sonicación es de 15 minutos. La sonicación se lleva a cabo en agitación constante con imán sobre placa y en baño de hielo.

Disruptor

La ruptura de células también se produce utilizando fuerza ultrasónica pero en este equipo la ruptura es más rápida, lo cual es preferible en el caso de sintetizar una proteína muy sensible al efecto de proteasas, como es en este caso. Para su

utilización se debe seguir un protocolo exhaustivo para su correcta limpieza. El disruptor utilizado fue un modelo TS 0.75KW de la marca 'Constant Systems Limited'.

2.2.1.9. Eliminar desechos celulares

Para ello se lleva el producto de la ruptura celular a centrifugar a 13000rpm y 4°C durante 1h, en una centrífuga Beckman Coulter modelo J-26 XP, rotor JLA 16.250 de botes de 250ml. El sobrenadante obtenido se lleva a un matraz u otro recipiente adecuado y se coloca en un baño a 42°C durante 3 horas. Tras esto se lleva a una cámara fría donde permanecerá en agitación O/N.

2.2.2. Purificación de (EI)₂-eGFP

2.2.2.1. Centrifugaciones a 4°C y 37°C

Al día siguiente se toma el contenido del matraz a 4°C y se pasa a botes de centrifugación de 250ml, entonces se lleva a centrifugar a 13000 rpm y 4°C, durante 25 minutos en la misma centrífuga Beckman Coulter antes mencionada. El sobrenadante se recoge en botes de centrifugación nuevos y el pellet se guarda en un en la cámara fría.

Al sobrenadante se le añade NaCl hasta una concentración de 2M. Luego se lleva a un baño a 42°C y a los 5 minutos se comprueba que el polímero precipita (si no fuese así se debe añadir más sal, hasta un máximo de 5M), una vez precipitado se mantiene en el baño a 42°C durante 30 minutos.

Tras esto se hace una centrifugación a 8000rpm, 40°C durante 15' en centrífuga Sigma modelo 4K15, rotor 12256. De esta centrifugación el sobrenadante se decanta, se toma una muestra de 20 µL, y se almacena en la cámara fría; y al pellet se le añade mQ fresca (aproximadamente 50ml), se vortea y se coge una muestra de 20 µL. Esto se lleva a cámara fría y se deja en agitación O/N a 4°C. Este proceso se repite hasta obtener pellets de las centrifugaciones a 4°C muy pequeños y los sobrenadantes de las centrifugaciones a 37°C claros.

2.2.2.2. Diálisis

El contenido a dializar se introduce en una o varias tripas de diálisis y estas se llevan primero a un bidón con 25L de agua destilada a 4°C con un agitador, donde permanecerá toda la noche. Tras esto se cambian a otro bidón con otros 25L de agua destilada donde de nuevo permanecerá toda la noche, y el último cambio se hace en un bidón lleno de 25L de agua MQ. Finalizada la diálisis se ajustar el pH de la solución resultante a 7.5-8 tras lo cual se congela a -20°C y se lleva a liofilizar.

2.2.2.3. Liofilización

Esta es la última fase de la purificación, en la cual se mete el producto de la diálisis congelado en una cámara de vacío para realizar la separación del agua por sublimación. El polímero se mantendrá en el liofilizador hasta que se haya eliminado el agua por completo, lo que suele ser un periodo de 4-5 días.

En la fig. 7 se muestra un esquema de todo este proceso de purificación explicado.

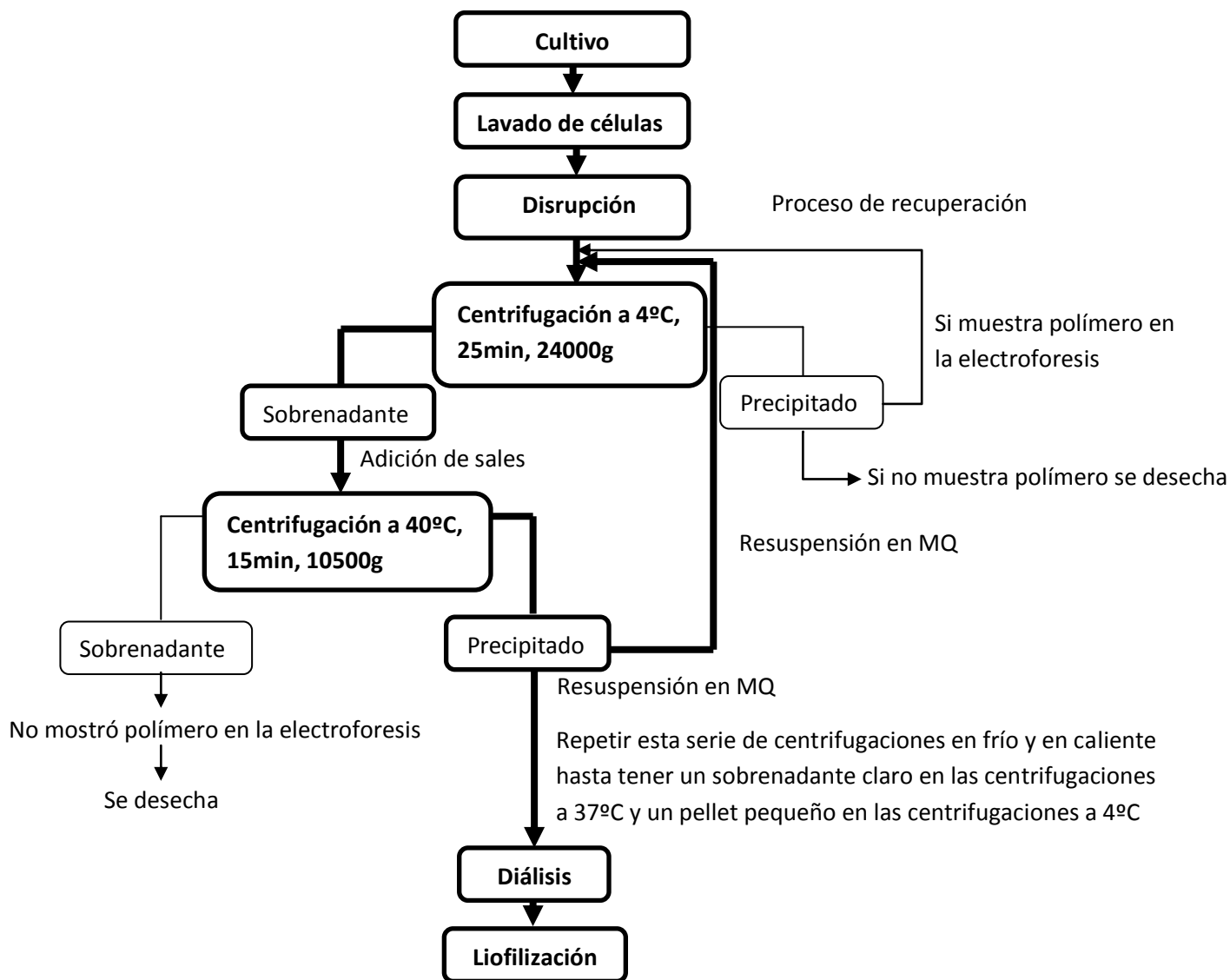


Fig. 7. Esquematzación del proceso de purificación de polímero

2.2.3. Introducción del gen PAP al plásmido pDrive All

2.2.3.1. Subcloning

El objetivo de este paso es la clonación del plásmido con el que se va a trabajar. El plásmido inicial se trata de un plásmido pUC57 que contiene el gen de la PAP (comprado a la compañía 'Nzytech, genes & enzymes'), y fue proporcionado por el grupo de investigación BIOFORGE. Para llevar esta clonación a cabo se utilizó la cepa bacteriana denominada XL-1 Blue Subcloning Grade Competent Cells, que viene con un protocolo recomendado por el fabricante.

2.2.3.2. Extracción del plásmido pUC57-PAP de la cepa de clonado

En este paso se extrae el plásmido de las células, para lo cual se usa un kit que viene con el protocolo que hay que seguir. EL kit utilizado es NucleoSpin® Plasmid, de la casa comercial Macherey-Nagel. Extraído el plásmido con el gen de la PAP clonado por las células se mide la concentración obtenida mediante un análisis de la cantidad de ácidos nucleicos en el Nanodrop.

2.2.3.3. Digestión preparativa

Tras comprobar para comprobar que el plásmido obtenido contiene el gen de interés (proteína PAP) con una digestión analítica con las enzimas *EcoR* I y *HIND* III se hace una digestión preparativa para la extracción de este gen. Esta digestión se hizo con la enzima *Ear* I, ya que el plásmido tiene dos sitios de corte para esta enzima de restricción a los extremos del gen. La reacción se lleva a cabo O/N a 37°C.

Realizada la digestión se prepara el gel preparativo y se realiza la electroforesis y el gel resultante se tiñe en una cubeta con unos 45mL de agua MQ a los que se le añaden 4.5µL del colorante SimplySafe™ (que está 10000 veces concentrado). Una vez teñido se extrae la banda de interés.

A continuación se procede a la purificación de la banda de DNA extraída, para ello se utiliza el kit PureLink™, Quick Gel Extraction Kit, de la casa comercial invitrogen, que viene con el protocolo a seguir. La alícuota de DNA purificado se lleva al nanodrop para medir la concentración resultante.

2.2.3.4. Ligación del gen PAP al plásmido pDrive all

Una vez extraído el gen PAP del plásmido *pUC57*, se hace una digestión con la enzima de ligación *T4 DNA ligasa* para introducir este gen en el plásmido pDrive All. Este es un plásmido mutado para tener un único sitio de corte para la enzima de restricción *Sap* I, lo que nos permitirá linealizar el plásmido mediante una digestión con esta enzima. La reacción de ligación se deja incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.

2.2.3.5. Transformación del pD-PAP

El plásmido pDrive All, ya con el gen PAP, se introduce en una cepa de de células XL1-Blue Competent Cells, que vienen con un protocolo a seguir, que lo replican. Para extraer el plásmido de las células se usa el mismo kit y procedimiento explicado anteriormente.

2.2.4. Obtención del plásmido con el gen del (EIS)₂-PAP

Para ello se utilizaron los mismos procedimientos explicados en el paso anterior. Tras una digestión analítica con *Eco* RI para comprobar que el inserto PAP en el plásmido pDrive se realizó correctamente, se lleva a cabo una digestión preparativa con *Sap* I de la cual se extrajo el plásmido pD-PAP linealizado. A este plásmido se le sometieron a dos defosforilaciones, una con la enzima *FastAP fosfatasa*, y otra con *SAP* y se procedió a su ligación con en inserto (EIS)₂, proporcionado por Arturo Ibañez Fonseca, miembro del grupo de investigación BIOFORGES. Tras la ligación se realizó la transformación de este plásmido en una cepa de células XL1-Blue Competent cells.

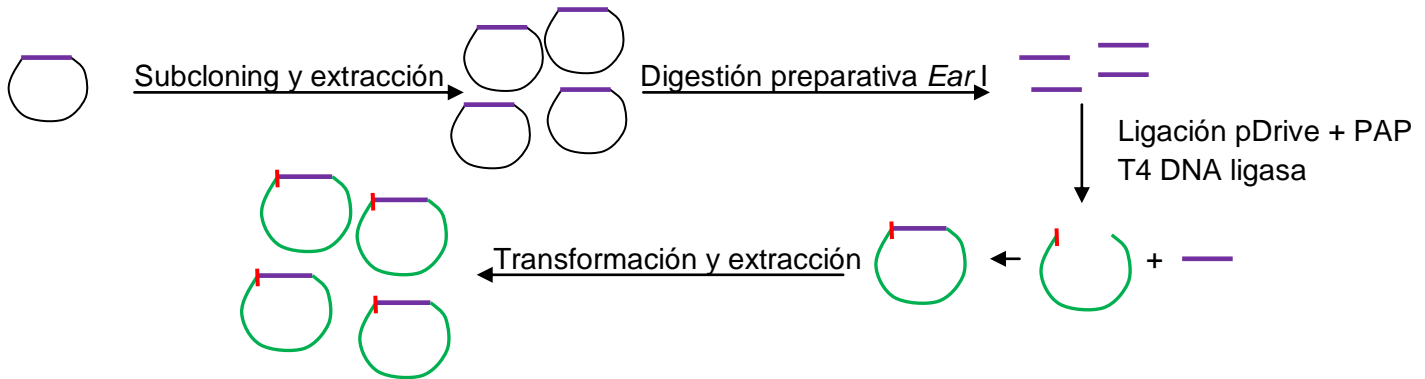
2.2.5. Obtención del plásmido con el gen del polímero RGD-(EIS)₂-PAP

Para la obtención del gen completo, tras extraer el plásmido con el gen (EIS)₂-PAP de las células y comprobarlo mediante una digestión analítica con *Eco* RI, se hizo una digestión preparativa con *Sap* I y se extrajo el plásmido linealizado. Tras esto se defosforiló con las mismas fosfatasas antes mencionadas y finalmente se llevó a cabo la ligación del plásmido pD (EIS)₂-PAP linealizado y defosforilado con el inserto RGD, se introdujo en las células XL1-Blue Competent cells para su clonación, y se purificó.

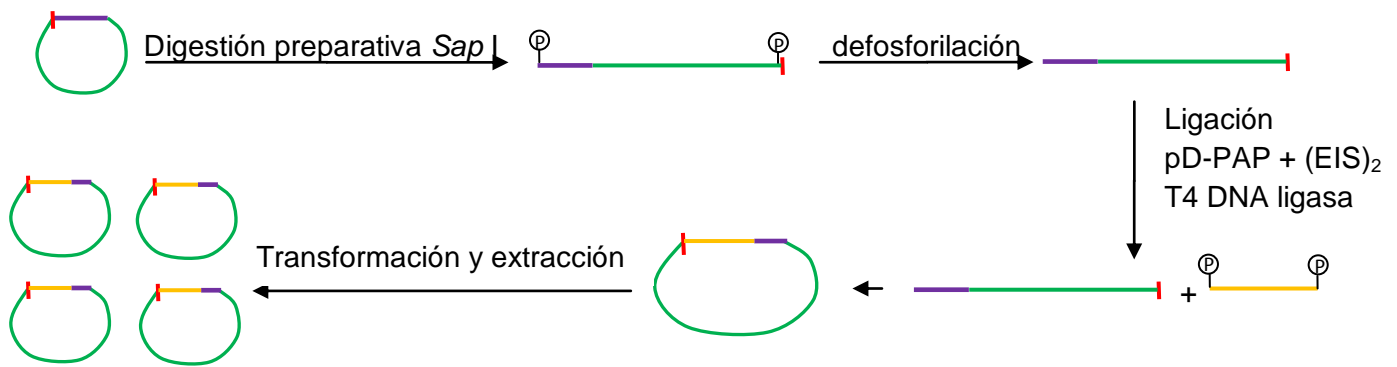
Las muestras purificadas se llevaron a secuenciar para poder asegurar que la síntesis del gen se llevó a cabo correctamente.

En la figura a continuación se muestra un resumen de todo el proceso de la síntesis del gen RGD-(EIS)₂-PAP.

Introducción del gen PAP al plásmido pDrive All



Obtención del plásmido con el gen del (EIS)₂-PAP



Obtención del plásmido con el gen del polímero RGD-(EIS)₂-PAP

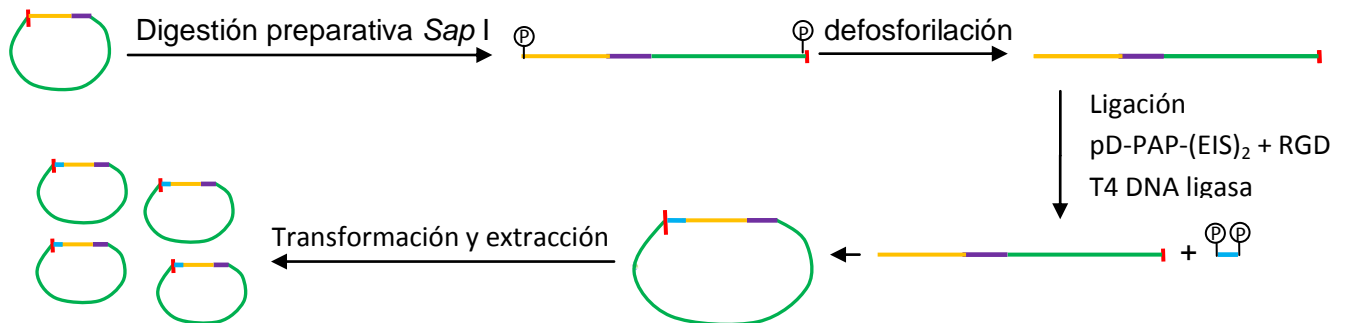


Fig. 8. Representación esquemática del proceso de síntesis del gen RGD-(EIS)₂-PAP

3. Resultados y discusión

3.1. Producción del polímero (EI)₂-eGFP

3.1.1. Screening para la selección de la colonia a cultivar

A continuación se muestra el screening realizado para la elección de la colonia de producción.

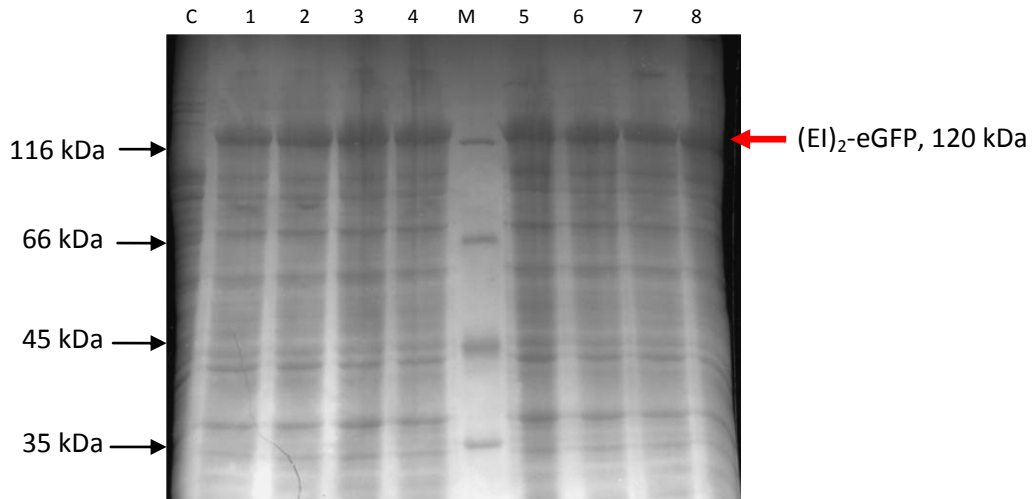


Fig. 9. Screening para la elección de colonia. El primer pocillo (C) muestra un control negativo, los números del 1 al 8 representan las 8 colonias picadas, y la M (en el centro) es el Marker.

En este caso se eligió la colonia 2, por ser donde se observó una mayor expresión de la proteína de interés y un mayor contraste en comparación con el resto de proteínas.

3.1.2. Curva de crecimiento

Para realizar la curva de crecimiento se inocularon 30ml de inóculo en 500ml de medio. Esto se hizo por triplicado en tres erlenmeyer. Desde el inóculo (tiempo 0) se tomaron muestras de cada uno de estos erlenmeyer a cada hora para medir su absorbancia a 600nm, y a cada media hora cuando se empezaron a intuir cambios exponenciales en la curva. El resultado se muestra en la figura 10.

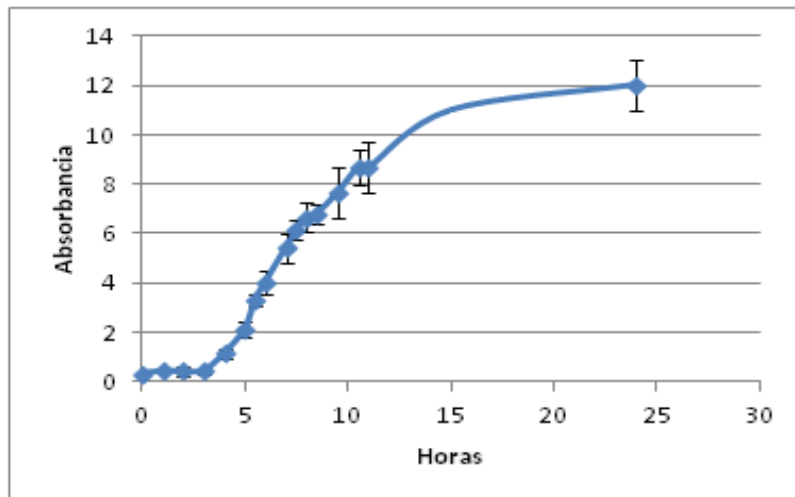


Fig. 10. Curva de crecimiento a través de la absorbancia de la producción del polímero (EI)₂-eGFP

Como se puede apreciar la curva de crecimiento resultante sigue la forma de una curva de crecimiento microbiano típica, con una lag phase inicial en la que no se produce cambio en la absorbancia, la fase de crecimiento exponencial, y la fase estacionaria. En este la fase estacionaria se alcanza cuando el valor de absorbancia está en torno a 12.

Con las muestras tomadas para hacer este seguimiento se hizo una electroforesis para observar el la cantidad de polímero producido y observar su relación con la cantidad de biomasa. El resultado se muestra en la figura a continuación.

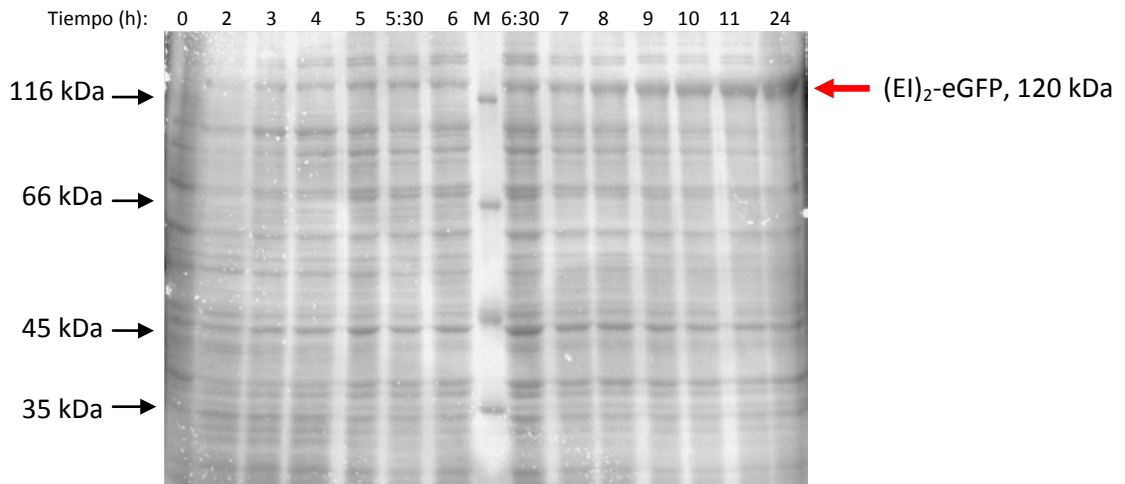


Fig. 11. Electroforesis de las muestras tomadas del cultivo en crecimiento a diferentes tiempos.

Como se observa la cantidad de polímero está directamente relacionado con la biomasa producida, alcanzando un máximo en la fase estacionaria. Como esta técnica ofrece un análisis cualitativo se llevó a cabo la cuantificación de la fluorescencia emitida por la eGFP unida al polímero.

3.1.3. Seguimiento de la fluorescencia

A partir de las mismas muestras tomadas a diferentes tiempos para la curva de crecimiento, que fueron normalizadas para llevar a cabo la electroforesis antes mostrada, se hizo una evaluación de la fluorescencia, en medidas relativas de fluorescencia, RFU (relative fluorescence units), preparando dos pocillos de cada muestra tomada en una placa de 12x8 pocillos. A continuación se muestra la media de los resultados obtenidos para cada tiempo.

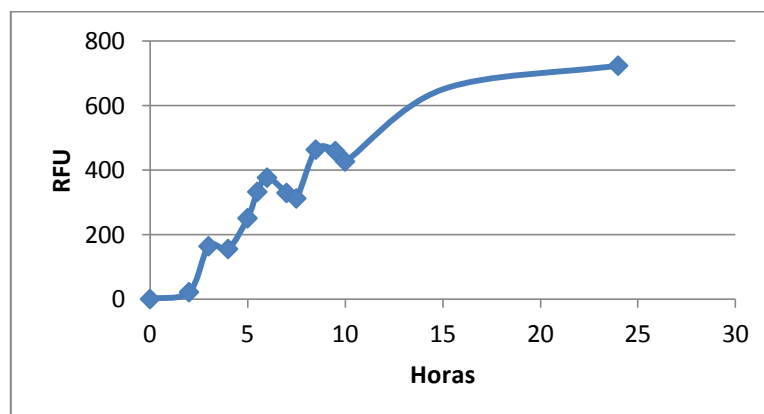


Fig. 12. Curva de crecimiento a través de la fluorescencia de la producción del polímero $(EI)_2$ -eGFP

De nuevo se observa (esta vez cuantitativamente) que la producción máxima del $(EI)_2$ -eGFP se corresponde con la fase estacionaria del crecimiento microbiano. Las pequeñas variaciones observadas se atribuyen a errores en el pipeteo durante la preparación de la muestra.

3.1.4. Purificación del $(EI)_2$ -eGFP

Siguiendo el proceso de purificación antes explicado se tomaron muestras de cada una de las fases separadas en cada etapa de separación, las cuales se llevaban a electroforesis para llevar un seguimiento de la purificación del polímero. A continuación se muestra el resultado de esta purificación. La primera figura (Fig. 13) muestra el seguimiento del polímero durante las primeras fases de purificación.

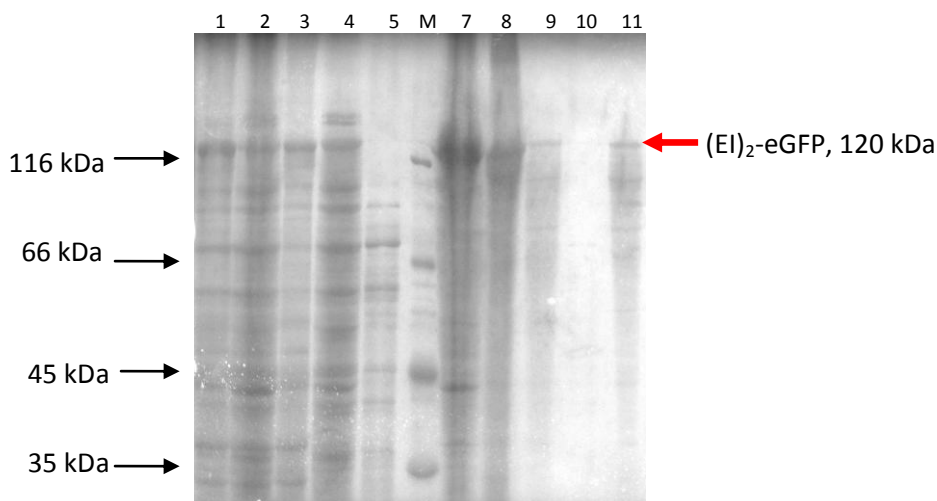


Fig. 13. Electroforesis de los primeros ciclos de purificación del polímero. Las calles 1 y 2 corresponden respectivamente al pellet y el sobrenadante de la centrifugación de eliminación de desechos celulares; la 3 y 4 al pellet y el sobrenadante de la primera centrifugación de purificación a 4°C. Los pocillos 5 y 7 muestran el sobrenadante y el pellet de la primera centrifugación a 37°C; 8 y 9, el pellet y el sobrenadante de la segunda centrifugación de purificación a 4°C; y 10 y 11 → sobrenadante y el pellet de la segunda centrifugación a 37°C.

Como se observa en la imagen, en los pellet resultado de las centrifugaciones a 4°C aún queda polímero, por lo que se recuperaron estos pellet y se volvieron a purificar. A continuación se muestran las últimas fases de purificación del polímero.

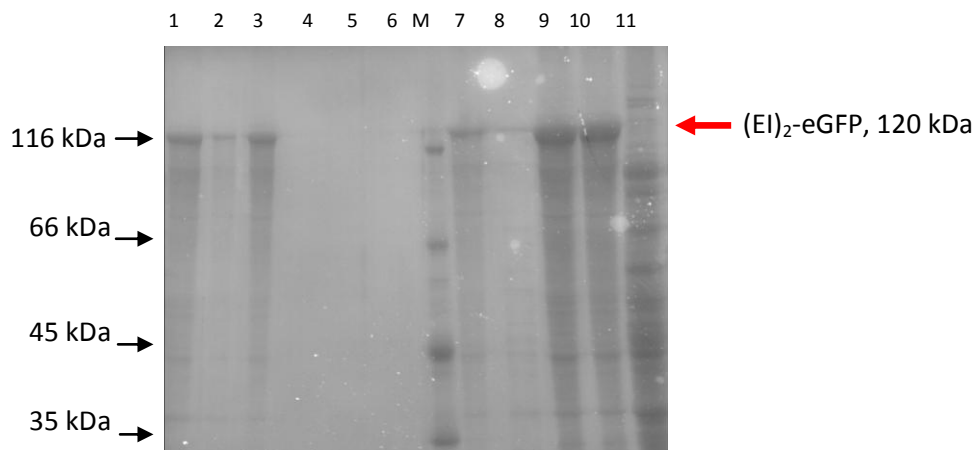


Fig. 14. Electroforesis de las últimas etapas de purificación del polímero $(EI)_2$ -eGFP. En esta imagen los pocillos 1, 2, y 3 corresponden a los sobrenadantes de la cuarta centrifugación a 4°C que se le hizo a la producción (1), a la primera recuperación (2), y a la segunda (3) respectivamente. Las muestras 4, 5, y 6 son los sobrenadantes de la cuarta centrifugación a 37°C que se hizo a estas muestras, comprobando que no hay polímero en ellas. Como anteriormente la M simboliza el Marker. Las calles 7, 8, 9, y 10 son muestras de los pellet de la tercera y cuarta centrifugación a 37°C de la producción (8, y 9), la cuarta centrifugación de la recuperación 1 (7) y de la recuperación 2 (10). La calle 11 muestra un control negativo.

Las centrifugaciones a 37°C realizadas en la purificación del polímero son más eficaces que las realizadas a 4°C, ya que en estas se encuentran restos de polímero en los pellet. Esto es debido a que la transición del polímero es más lenta cuando pasa de temperaturas por encima de la T_t a temperaturas por debajo de esta.

3.2. Caracterización físico-química del polímero

A continuación se muestran los resultados de los experimentos que se hicieron para la caracterización del polímero $(EI)_2$ -eGFP producido.

3.2.1. Determinación de la pureza mediante SDS-PAGE

Una vez purificado el polímero se tomó una muestra para realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) cuyo resultado se muestra en la imagen a continuación.

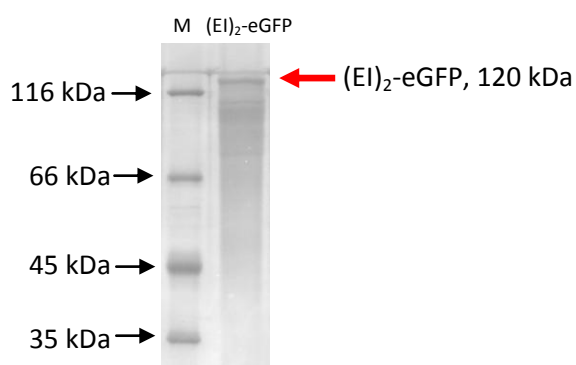
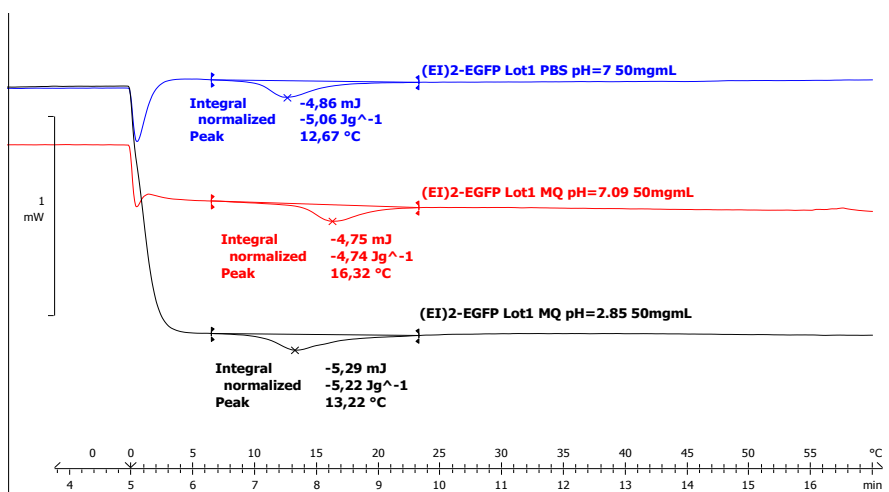


Fig. 15. SDS-PAGE del $(EI)_2$ -eGFP liofilizado a la concentración de 1mg/ml

Tras la cuantificación de las bandas se confirmó una pureza del 86%. del $(EI)_2$ -eGFP producido de la masa atómica esperada: 120kDa.

3.2.2. Determinación de la temperatura de transición por Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Con el polímero $(EI)_2$ -eGFP obtenido se hicieron tres soluciones a la misma concentración, 50mg/ml. Dos de ellas en PBS y en MQ a pH 7, y otra en MQ a pH 3. Mediante estos experimentos se obtuvieron las temperaturas de transición (T_t) como se ve en la figura con los resultados que se muestra a continuación:



$(EI)_2$ -eGFP	T_t (°C)
PBS, pH 7	12.67
MQ, pH 7	16.32
MQ, pH 3	13.22

Fig. 16. Curvas del DSC con las T_t del $(EI)_2$ -eGFP en soluciones de PBS y MQ a pH neutro, y en MQ a pH ácido.

Como se observa en la imagen la T_t del polímero en una solución de PBS a pH neutro es de 12.67°C, en una solución de MQ a pH neutro la T_t es de 16.32°C, y a pH ácido de 13.22°C. De la bibliografía se conoce que la T_t del $(EI)_2$ sin la eGFP en PBS es de 8.11°C [24], por lo que la ligación a la eGFP ha aumentado la temperatura de transición.

3.2.3. Determinación de la composición por espectroscopia de resonancia magnética nuclear, RMN-H.

Mediante esta técnica se realizó un espectro monodimensional de Hidrógeno, que da información del número y tipo de hidrógenos diferentes que hay en la molécula. La posición en el espectro determina el entorno químico del núcleo, y por tanto da información de grupos funcionales a los que pertenecen estos hidrógenos. Conociendo la composición teórica del polímero se compara con los resultados obtenidos que se muestran a continuación.

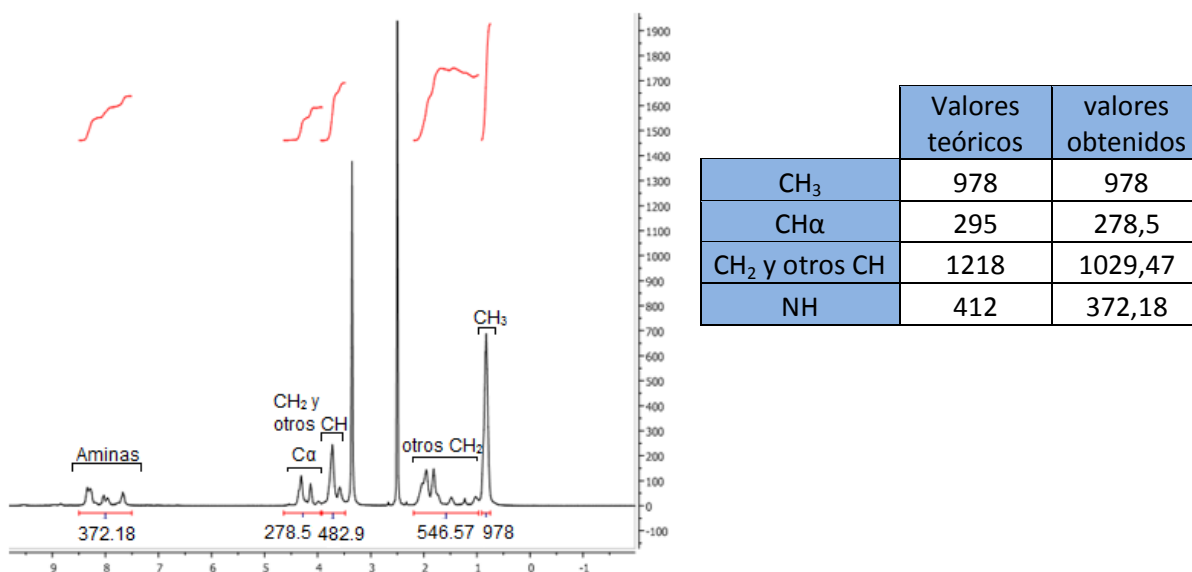


Fig. 17. Espectro monodimensional de hidrógeno del $(EI)_2$ -eGFP obtenido. Comparación de los valores teóricos (conocida su composición) con los valores obtenidos

Como se aprecia los valores medidos son equiparables a los valores teóricos por lo que se confirma que la composición del polímero es la correcta.

3.3. Caracterización física de nanopartículas. Dynamic Light Scattering (DLS)

3.3.1. Nanopartículas formadas por $(EI)_2$ -eGFP

Con el polímero $(EI)_2$ -eGFP purificado se hicieron soluciones seriadas de 10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.25, 0.1, y 0.05mg/ml en PBS, con el objetivo de estudiar las nanopartículas que se forman con este polímero a varias concentraciones, y obtener la concentración micelar crítica (CMC), concentración mínima a la cual se forman partículas. Las disoluciones a estas concentraciones fueron medidas a 5°C y 37°C. A continuación se muestra una gráfica con los datos obtenidos.

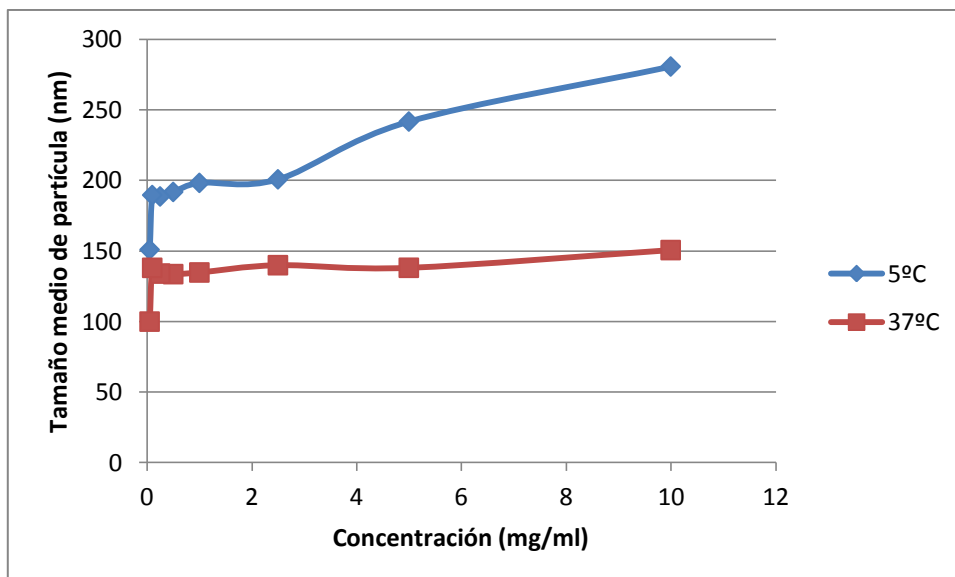


Fig. 18. Nanopartículas formadas por el polímero (EI)₂-eGFP a diferentes concentraciones

Como se aprecia en esta figura las nanopartículas formadas dependen en una gran medida de la concentración de polímero. En este caso se observa una CMC de 0.05mg/ml.

3.3.2. Comparación con el polímero (EIS)₂-eGFP proporcionado

Este mismo sistema se utilizó para la medición de nanopartículas por el polímero (EIS)₂-eGFP a diferentes concentraciones. En la figura 19 se comparan los resultados obtenidos en el apartado anterior con los del polímero con el grupo 'Silk'.

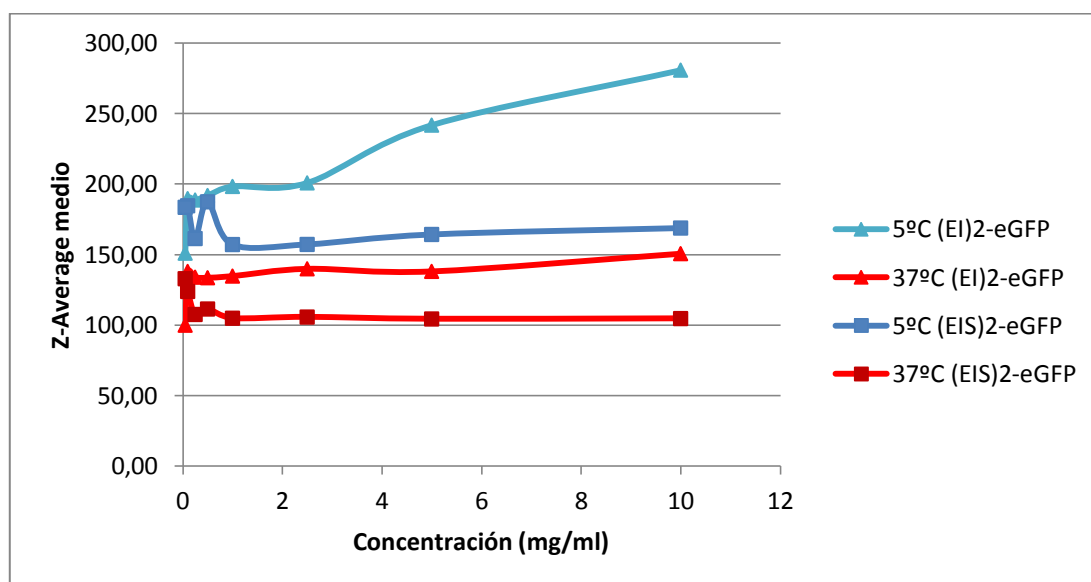


Fig. 19. Comparación de las nanopartículas formadas por (EI)₂-eGFP, y (EIS)₂-eGFP

Las partículas formadas por el polímero (EIS)₂-eGFP demostraron una estabilidad mucho mayor en la variabilidad de su diámetro en función de la concentración. Como se observa en esta comparación, se observó la formación de nanopartículas a 5°C, cuando a esta temperatura no se debería producir formación de nanopartículas debido

a la transición del polímero. Para explicar este fenómeno en el caso del $(EIS)_2$ -eGFP se estableció la hipótesis de que el polímero en disolución tiene una estructura preformada debido al grupo *Silk*, por lo que las partículas visualizadas a 5°C serían las mismas partículas observadas a 37°C pero con la estructura hidratada, lo que causa ese aumento en el diámetro medio de las nanopartículas.

Para probar esta hipótesis se disolvieron 15mg del polímero $(EIS)_2$ -eGFP en ácido fórmico, tras lo cual se dializó y liofilizó. Se siguió este procedimiento para que el ácido fórmico rompiera los enlaces entre los grupos *Silk*, deshaciendo así cualquier estructura preformada debido a este grupo.

3.3.3. Nanopartículas de $(EIS)_2$ -eGFP disuelto en ácido fórmico

El ácido fórmico se utiliza para extraer los grupos *Silk* de la seda. En este caso se utilizó con el objetivo de que rompiera las uniones iniciales entre los grupos *Silk*, asegurándonos de que no eran los responsables de ninguna estructura preformada. Los resultados obtenidos del polímero $(EIS)_2$ -eGFP tratados con ácido fórmico se muestran a continuación.

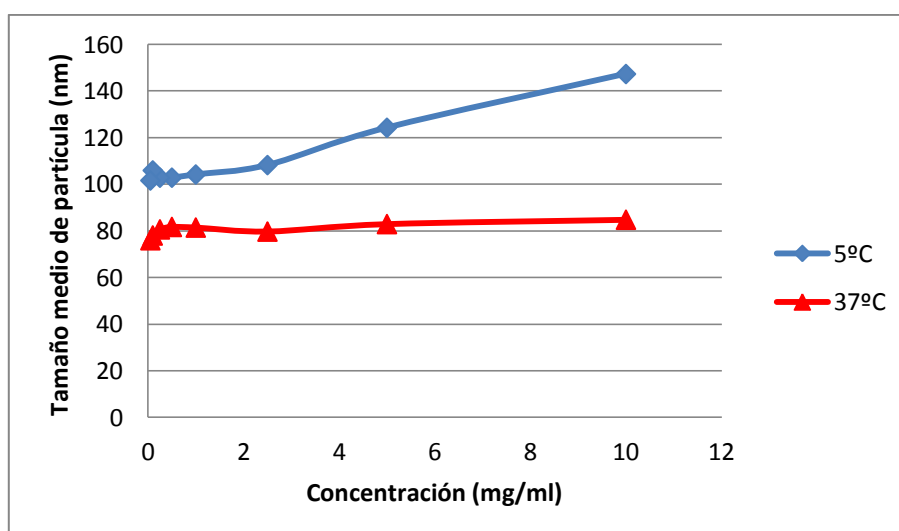


Fig. 20. Tamaño de nanopartículas formadas por el polímero $(EIS)_2$ -eGFP tratado con ácido fórmico.

En este caso se observa que al deshacerse las estructuras preformadas por el polímero el tamaño de las nanopartículas tiene una variación mayor con respecto a la concentración de polímero, formando partículas mayores a concentraciones más altas. No obstante sigue tratándose de una medida mucho más estable en comparación con el polímero $(EI)_2$ -eGFP sin el grupo *Silk*.

En vista de los resultados, y pensando en el futuro uso del polímero como un dispositivo de administración, la formación de nanopartículas estables en un amplio rango de concentraciones es una propiedad conveniente, ya que nos permite controlar de forma mucho más eficaz las propiedades de del dispositivo resultante. Los tamaños obtenidos también son convenientes para esta aplicación por lo que se decidió continuar con el estudio del polímero $(EIS)_2$ -eGFP.

3.3.4. Estudio de la estabilidad con el tiempo de las nanopartículas formadas por $(EIS)_2$ -eGFP

Se estudió si las nanopartículas formadas por el polímero $(EIS)_2$ -eGFP mantenían su estabilidad con el tiempo. Para ello se midieron las nanopartículas de dos soluciones de este polímero a 1, y 5mg/ml tanto en PBS como en agua MQ, durante 15 días, para así también poder estudiar el efecto de las sales presentes en el PBS (fig. 21). Realizadas las medidas se observó que estas sales tienen un efecto estabilizador en la formación de partículas mientras que su ausencia provoca una gran variabilidad en el tamaño de las nanopartículas formadas tras la transición del polímero.

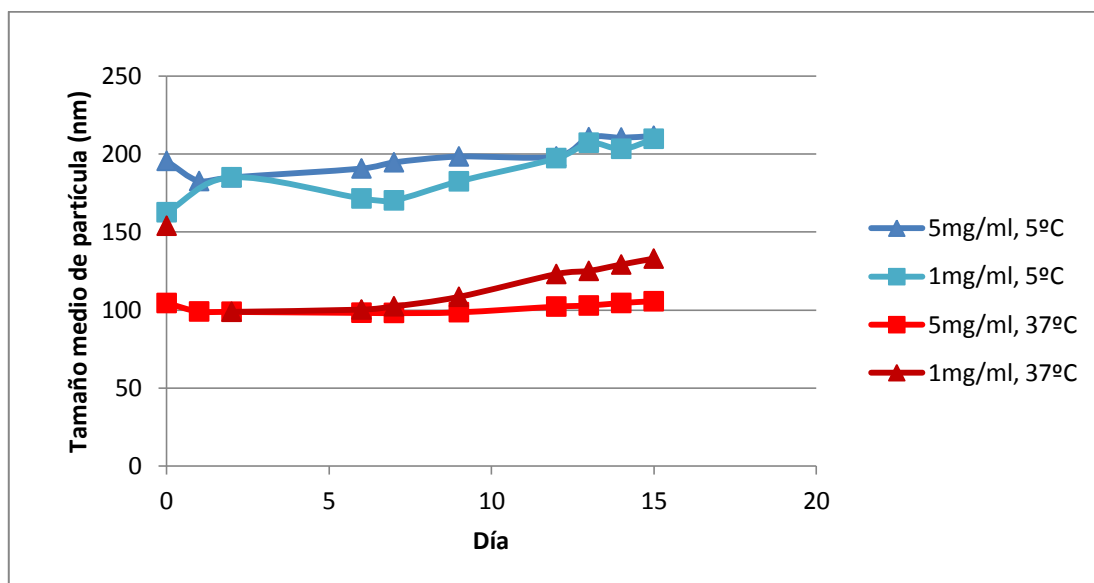


Fig. 21. Estudio de las soluciones a 5 y 1mg/ml de $(EIS)_2$ -eGFP en PBS respecto al tiempo.

3.4. Sustitución de la eGFP por PAP

Estudiadas las propiedades de estos dos polímeros unidos a eGFP se decidió utilizar la capacidad del $(EIS)_2$ para formar nanopartículas estables en un gran rango de concentraciones [0.25-10mg/ml], de un tamaño en torno a unos 100nm a 37°C como dispositivo de administración. En este caso se utilizó la proteína eGFP como modelo y se propuso ser sustituida por la proteína PAP, de tamaño similar.

El objetivo de ligar la proteína PAP al polímero $(EIS)_2$ es el de dar a esta proteína un dispositivo a través del cual pueda formar nanopartículas asumibles por las células, para que pueda internalizarse en ellas y realizar su acción antiviral inhibiendo la síntesis de proteínas en aquellas células infectadas. En este apartado se describe el proceso para la creación del gen.

3.4.1. Extracción del gen PAP mediante digestión preparativa del plásmido pUC57-PAP con la enzima *EarI*.

Primero se extrajo la secuencia de DNA que codifica la proteína PAP del plásmido pUC57. El gen optimizado para *E. coli* tiene un tamaño de 828bp, y su secuencia se muestra en el anexo. A continuación se muestran las fotos del gel de agarosa del que se extrajo la banda con el gen de la proteína PAP, tanto antes del corte (izquierda de la Fig. 22), como después (derecha).

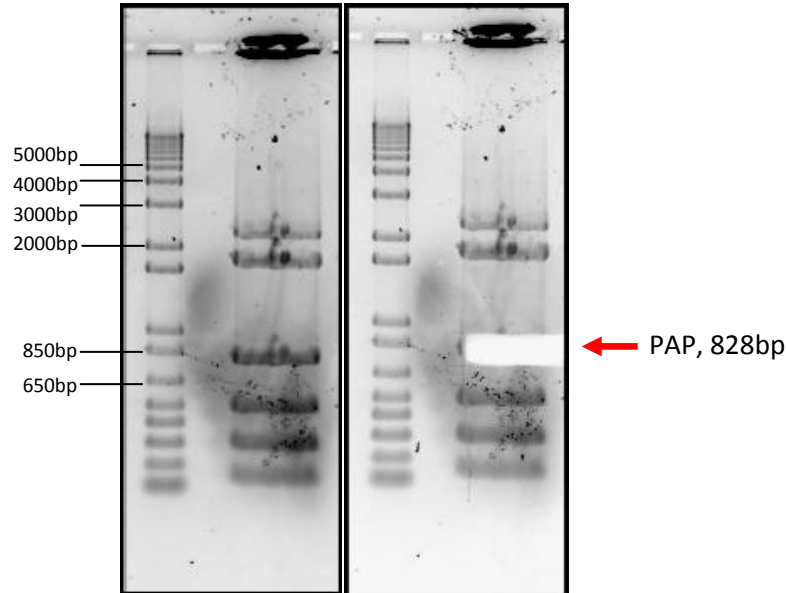


Fig. 22. Extracción del gen PAP del plásmido pUC57.

3.4.2. Ligación del gen PAP al plásmido pDrive y obtención del pD-PAP linealizado.

El gen extraído se introdujo en el plásmido pD All descrito en la figura 6 de la sección de 'materiales'. Tras esta ligación (para la cual se utilizó la enzima T4 ligasa) se obtuvo el plásmido linealizado mediante una digestión con la enzima *SapI*. El tamaño del plásmido es de 3938bp, si le sumamos las 828bp del gen PAP el tamaño resultante es de 4766bp. El resultado de esta digestión se muestra a continuación.

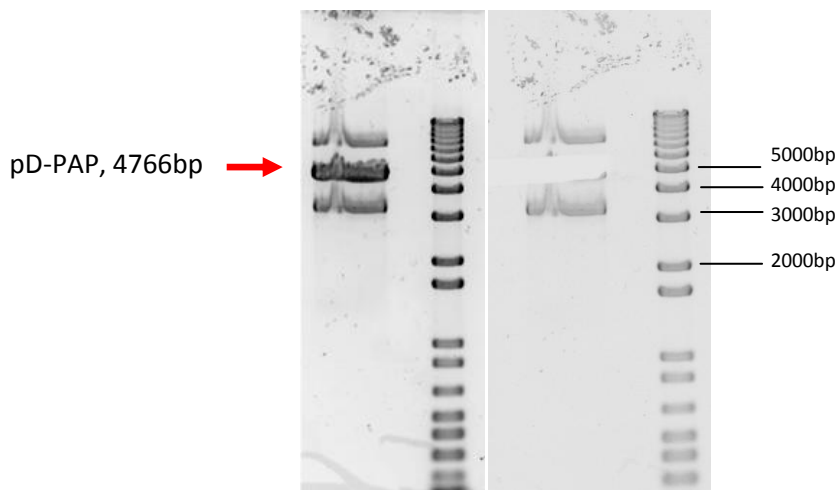


Fig. 23. Obtención del plásmido pDrive ligado al gen PAP (pD-PAP) linealizado

En este caso las otras dos bandas pertenecen a formas del plásmido no linealizadas, debido a que la digestión no ha sido 100% efectiva (indicador de que una mayor cantidad de enzima es necesaria para digerir toda la cantidad de plásmido introducido).

El plásmido linealizado obtenido se sometió a dos defosforilaciones, una utilizando la enzima FastAP y otra mediante la enzima SAP para asegurar una defosforilación completa, lo que va a ser vital para que el plásmido asimile el nuevo inserto y no forme el enlace fosfodiéster con sí mismo, cerrándose e impidiendo la inserción.

3.4.3. Ligación del pD-PAP a la secuencia que codifica el polímero (EIS)₂.

El plásmido pD-PAP linealizado y defosforilado se ligó a la secuencia del polímero (EIS)₂. Tras la ligación se linealizó el plásmido de nuevo (digestión con *SapI*). En este caso a las 4766bp anteriores se les debe añadir las 3690pb del inserto (EIS)₂, por lo que el plásmido linealizado se encontrará en un tamaño de 8456bp. El resultado de esta etapa se muestra a continuación.

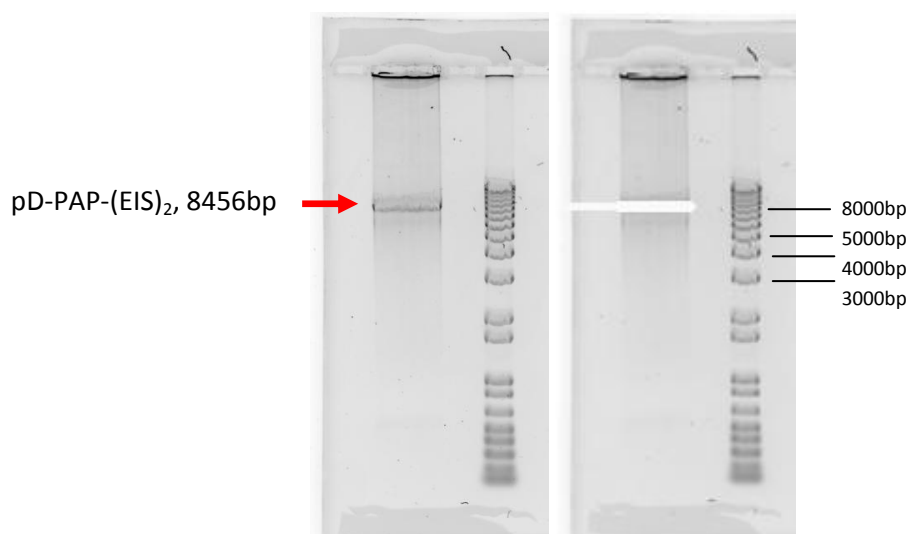


Fig. 24. Obtención del plásmido pD-PAP-(EIS)₂ linealizado

De nuevo, el plásmido se sometió a dos defosforilaciones para prepararlo para su última ligación al dominio de adhesión RGD.

3.4.4. Obtención del gen RGD-(EIS)₂-PAP

Finalmente se realizó la última ligación del dominio RGD al pD-PAP-(EIS)₂. El dominio RGD tiene un tamaño de 87bp, sumado al plásmido con el inserto se obtiene un tamaño total de 8543bp. Tras cada ligación se realizó una secuenciación para comprobar que el inserto se había introducido debidamente. De esta manera se comprobó el gen de la proteína PAP se introdujo correctamente en el plásmido, también que el inserto (EIS)₂ se ligó correctamente, y finalmente que el grupo RGD se unió al extremo del grupo amino (siendo en este caso especialmente importante ya que al tratarse de un inserto tan pequeño no se puede comprobar con total seguridad la eficacia de esta ligación mediante una digestión analítica), obteniendo el gen deseado, RGD-(EIS)₂-PAP.

Para la adhesión de las nanopartículas a las células tumorales y la internalización de la proteína PAP a estas células se ligó a la unión (EIS)₂-PAP el dominio RGD. Finalmente, tras que los resultados de la secuenciación en cada etapa confirmaran que el proceso se llevó a cabo correctamente, se obtuvo el gen completo de este nuevo polímero cuya estructura se muestra en la figura 25.

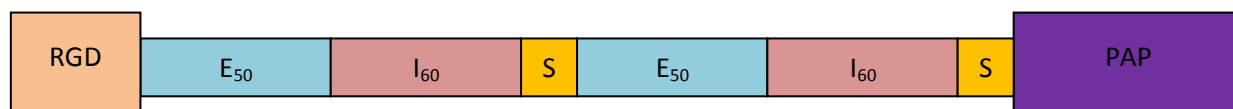


Fig. 25. Representación esquemática del polímero RGD-(EIS)₂-PAP

4. Conclusiones

Producción y purificación de (EI)₂-eGFP:

- En vista de los resultados de fluorescencia y cantidad de polímero observada por electroforesis se concluye que la producción del polímero está directamente relacionada con la cantidad de biomasa, por lo que para maximizar la producción esta se detiene cuando se alcanza la fase estacionaria, tras lo cual comienza el proceso de purificación.
- Se ha obtenido el polímero (EI)₂-eGFP con una pureza del 86% del tamaño esperado y con las propiedades de fluorescencia predichas.

Caracterización físico-química del (EI)₂-eGFP:

- Las sales presentes en el PBS disminuyen la temperatura de transición del (EI)₂-eGFP en unos 4°C.
- A pH ácido la temperatura de transición también es menor debido a que se rompen los puentes de hidrógeno formados por las zonas hidrofílicas a pHs por debajo del pKa. Al romperse estas interacciones la energía necesaria para la transición es menor, por lo que la temperatura de transición disminuye.

Caracterización de nanopartículas de (EI)₂-eGFP y (EIS)₂-eGFP:

- El polímero (EI)₂-eGFP forma nanopartículas de tamaño variable en función de la concentración, con una CMC de 0.05mg/ml.
- El polímero (EIS)₂-eGFP forma nanopartículas estables en un gran rango de concentraciones [0.25-10mg/ml], de un tamaño en torno a unos 100nm a 37°C. Estas partículas también son estables en el tiempo (15 días).
- Eliminando las estructuras preformadas de los grupos *Silk* en el polímero (EIS)₂-eGFP con ácido fórmico el comportamiento descrito anteriormente se mantiene.

Construcción del polímero RGD-(EIS)₂-PAP

- Obtención del gen de un nuevo polímero híbrido que gracias a la secuenciación se confirmó que su construcción fue llevada a cabo correctamente

5. Perspectivas de futuro

El gen del nuevo polímero RGD-(EIS)₂-PAP se debe pasar a un plásmido de expresión para introducirlo en una cepa de *E.coli* y comenzar con su expresión, purificación y caracterización físico-química. Una vez obtenido y caracterizado el polímero, se debe comprobar si puede llevar a cabo los objetivos para los cuales se desarrolló, para ello se deben realizar ensayos para averiguar si la PAP unida al polímero conserva sus propiedades como proteína RIP, si las nanopartículas resultantes se adhieren correctamente a las células tumorales, si la proteína se internaliza o no por las células, si se conserva la selectividad de la proteína PAP de atacar sólo a las células tumorales... Para ello se recomiendan ensayos acelulares con extractos celulares para comprobar la toxicidad de la PAP, y ensayos en cultivos celulares para observar las interacciones del nuevo polímero con las células y sus efectos.

Desde el punto de vista estructural, también se podría introducir pequeñas variaciones a la secuencia genética del RGD-(EIS)₂-PAP, introduciendo algún dominio de corte entre la proteína PAP y el polímero (EIS)₂ que facilite el acceso de la PAP al citoplasma, sustituyendo el dominio RGD por otros dominios de adhesión, etc.

6. Agradecimientos

Para la realización de este proyecto ha sido de vital importancia la ayuda y colaboración de todos los miembros del grupo BIOFORGE. En especial quiero agradecer al tutor de este trabajo, Francisco Javier Arias Vallejo, su ayuda y guía en el enfoque y elaboración del proyecto, así como el haberme dado la oportunidad de trabajar en toda la parte genética presentada en este trabajo, ya que era un área más alejada de mi formación profesional y me ha permitido ampliar mucho mis conocimientos en biología molecular y genética.

También quiero agradecer a Arturo Ibáñez Fonseca su atención e implicación, especialmente a la hora del trabajo práctico en el laboratorio, pero también por sus recomendaciones y consejos que indudablemente han mejorado este trabajo.

Finalmente quiero recordar a los miembros del equipo BIOFORGE ya mencionados que ofrecieron parte de su trabajo (insertos, cultivos celulares en stock, plásmidos...) para poder llevar este a cabo, como, Sergio Acosta Rodríguez, María Jesús Piña Lancho, Constancio González Obeso, y, de nuevo, Arturo Ibáñez; y al resto de miembros de grupo de investigación por su disposición a ayudar y sus consejos para mejorar.

7. Referencias

- [1] El país.es. Nanociencia y nanotecnología. **Europa apuesta por la nanomedicina.** [e-journal]. Disponible en: <http://www.portalciencia.net/nanotecno/nanoeuropa.html> [Último acceso: 16 Junio 2015].
- [2] Laura M. Lechuga. Grupo de Biosensores. Instituto de Microelectrónica de Madrid. **Nanobioteconología: Avances diagnósticos y terapéuticos.** Disponible en: <http://www.madrimasd.org/revista/revista35/tribuna/tribuna2.asp> [Último acceso: 07 Julio 2015].
- [3] F. Javier Arias, Mercedes Santos, Alicia Fernández-Colino, Guillermo Pinedo and Alessandra Girotti. 2014. **Recent Contributions of Elastin-Like Recombinamers to Biomedicine and Nanotechnology.** Current Topics in Medicinal Chemistry, 2014, 14, 819-836.
- [4] Universidad de Valladolid. **Los polímeros en medicina. Polímeros biodegradables.** Disponible en: http://www.eis.uva.es/~macromol/curso05-06/medicina/polimeros_biodegradables.htm [Último acceso: 16 Junio 2015].
- [5] Arturo Ibáñez Fonseca. Supervised by Prof. Dr. José Carlos Rodríguez Cabello. **Synthesis and characterization of a Silk-Elastine-like-Recombinamer fused to enhanced green fluorescent protein (SELR-EGFP) for the achievement of self-assembled fluorescent nanoparticles and physically cross-linked hydrogels.** Facultad de Ciencias, Departamento de Física de la Materia Condensada, Cristalografía y Mineralogía.
- [6] Wikipedia. **Elastina.** Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Elastina>. [Último acceso: 16 Junio 2015].
- [7] Miren Itziar Sanjuna García. Supervisado por: Francisco Javier Arias Vallejo. **Desarrollo de nuevo polímero recombinantes tipo elastina para transfección celular.** Máster en investigación biomédica. Universidad de Valladolid. BIOFORGE.
- [8] José Carlos Rodríguez-Cabello, Alessandra Girotti, Artur Ribeiro, and Francisco Javier Arias. **Synthesis of Genetically Engineered Protein Polymers (Recombinamers) as an Example of Advanced Self-Assembled Smart Materials.**
- [9] Roger Y. Tsien. **The green fluorescent protein.** Howard Hughes Medical Institute; University of California, San Diego; La Jolla, CA 92093-0647.
- [10] Zhou Xiaopeng, Shi Qinghong, Xing Xinhui and Sun Yan. **Rapid Purification of Enhanced Green Fluorescent Protein from *Escherichia coli*.** Chinese J. Chem. Eng., 14(2) 229-234 (2006).
- [11] Jianghong Rao, Anca Dragulescu-Andrasi and Hequan Yao. **Fluorescence imaging 'in vivo'. Recent advances.** Current Opinion in Biotechnology 2007,18:17–25.
- [12] Brendan P. Cormack, Raphael H. Valdivia and Stanley Falkow. **FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP).** Gene, 173 (1996) 33-38.

- [13] Alicia Fernández Colino, F. Javier Arias, Matilde Alonso, and J. Carlos Rodríguez-Cabello. **Self-Organized ECM-Mimetic Model Based on an Amphiphilic Multiblock Silk-Elastin-Like Corecombinamer with a Concomitant Dual Physical Gelation Process.** [dx.doi.org/10.1021/bm501051t](https://doi.org/10.1021/bm501051t) | Biomacromolecules 2014, 15, 3781–3793.
- [14] Dominic C. Chow, Matthew R. Dreher, Kimberly Trabbic-Carlson, and Ashutosh Chilkoti. **Ultra-High Expression of a Thermally Responsive Recombinant Fusion Protein in *E. coli*.** Biotechnol. Prog. 2006, 22, 638-646.
- [15] Diego Pesce, Yuzhou Wu, Anke Kolbe, Tanja Weil, Andreas Herrmann. **Enhancing cellular uptake of GFP via unfolded supercharged protein tags.** Biomaterials 34 (2013) 4360e4367.
- [16] Kundu B, Rajkhowa R, Kundu SC, Wang X. **Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations.** Advanced drug delivery reviews 2013;65:457-70.
- [17] Megeed Z, Cappello J, Ghandehari H. **Genetically engineered silk-elastinlike protein polymers for controlled drug delivery.** Advanced drug delivery reviews 2002;54:1075-91.
- [18] Qiu W, Teng W, Cappello J, Wu X. **Wet-Spinning of Recombinant Silk-Elastin-Like Protein Polymer Fibers with High Tensile Strength and High Deformability.** Biomacromolecules 2009;10:602-8.
- [19] Luigi Barbieri, Gary M. Aron, James D. Irvin and Fiorenzo Stirpe. **Purification and partial characterization of another form of the antiviral protein from the seeds of *Phytolacca americana* L. (pokeweed).** Biochem. J. (1982) 203, 55-59.
- [20] Vanessa Olga Mardones. Advised by: Dr. John Tjostem. 1998. **A description of *P. Americana* and the basis of its ribosome inactivating and mitogenic constituents.**
- [21] G. Ravikiran, AB. Raju and Y. Venugopal. **Phytolacca americana: A Review.** ISSN: 2229-3701
- [22] Erkki Ruoslahti. **RGD and other recognition sequences for integrins.** Annual Review of Cell and Developmental Biology. Vol. 12: 697-715.
- [23] TambatTeesalu, Kazuki N. Sugahara and Erkki Ruoslahti. 2013. **Tumor-penetrating peptides.**
- [24] Laura Martín Maroto. Dirigida por: Dr. Matilde Alonso Rodrigo, y Dr. José Carlos Rodríguez Cabello. **Stimuli-responsive systems based on elastin-like recombinamers for biomedical applications.**

8. Anexo

Tabla 1. Tabla de reactivos químicos utilizados y sus casa comerciales

Reactivo	Casa comercial	Reactivo	Casa comercial
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	Apollo Scientific	Buffer fosfato salino (PBS)	Gibco
Ácido Clorhídrico	Merck	Fluorido fenil-metan-sulfonil (PMSF)	Sigma Aldrich
Acrilamida/Bisacrilamida	Amresco	Glicerol	Merck
Agarosa Seakem	Cambrex	Hidróxido sódico	Panreac
Agarosa MetaPhor	Cambrex	Isopropanol	Sigma Aldrich
Ampicilina	Formedium	Kanamicina	Formedium
Azul de bromofenol	Sigma Aldrich	Leupeptin	Apollo Scientific
Cloruro de cobre	Sigma Aldrich	Persulfato amónico (PSA)	Sigma Aldrich
Cloruro de sodio	Merck	Pepstatin A	Apollo Scientific
D(+)-Glucosa	Panreac	Tetrametilen diamin (TEMED)	Sigma Aldrich
Dodecilsulfato sódico (SDS)	Merk	Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS)	Sigma Aldrich
E-64	Apollo Scientific	2--mercaptoetanol (2-ME)	Merck
Etanol	Merk	β -Mercaptoetanol	Sigma Aldrich

Tabla 2. Geles de diferentes porcentajes de acrilamida con las cantidades optimizadas de sus componentes

Orden de adición	Producto	Resolving gel				Stacking gel
		7.5%	10%	12%	15%	
1	MQ	4.10ml	3.63ml	3.25ml	2.69ml	1.585ml
2	Tris 1.5M pH 8.8	1.88ml	1.88ml	1.88ml	1.88ml	-
	Tris 0.5M pH 6.8	-	-	-	-	625 μ l
3	Acrilamida 40%	1.4ml	1.875ml	2.25ml	2.81ml	250 μ l
4	SDS 10%	75 μ l	75 μ l	75 μ l	75 μ l	18.75 μ l
5	Persulfato 10%	37.5 μ l	37.5 μ l	37.5 μ l	37.5 μ l	18.75 μ l
6	TEMED	3.75 μ l	3.75 μ l	3.75 μ l	3.75 μ l	2.35 μ l

Para 400ml de tampón de sonicación se añadieron:

Tabla 3. Lista de inhibidores añadidos, su cantidad, enzimas objetivo, y mecanismos de acción.

Inhibidor	Proteasa que inhibe	Mecanismo	Concentración recomendada
PMSF	Serin/cystein proteasas, trypsina, quimiotripsina, papaina, y trombina	Inhibidor irreversible	450µl
EDTA	Metaloproteasas	Agente quelante. Desactiva enzimas metal-dependientes	1ml
E64	Cystein proteasas, papaina, bromelina, calpaína, catepsina B, H y L, Streptococcus proteasa, y ficin.	Inhibidor irreversible	250µl
Leupeptin	Serin/cystein proteasas, trypsina, plasminógeno, papaina, catepsina B, trombina y calpaina	Inhibidor irreversible	250µl
Pestatin A	Acid proteasa, aspartic proteasas, pepsina, catepsina D, renina, HIV- y MMTV-proteasas		250µl
AEBSF	Serine proteasas, trombina, quimiotripsina, calicreína, pasminógeno, proteinasa K, y tripsina	Inhibidor irreversible por sulfonilación de un grupo funcional en el centro activo	250µl