

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

Facultad de Medicina

Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM)

Máster en Investigación Biomédica



MODIFICACIÓN DE VECTORES PLASMÍDICOS Y SU APLICACIÓN EN POLÍMEROS ELR PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS

Trabajo Fin de Máster presentado por:

Marcos Herrero Gutiérrez

Tutor:

Dr. F. Javier Arias Vallejo

Valladolid 2015/16

INDICE

1.- RESUMEN.....	1
2.- INTRODUCCIÓN.....	2
3.- OBJETIVOS.....	8
4.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
6.- CONCLUSIONES.....	26
7.- BIBLIOGRAFÍA.....	27

ABREVIATURAS

BBP: azul de bromofenol
bp: pares de bases
cfu: colony forming unit
DNA: Ácido desoxirribonucleico
dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato
ELR: elastin-like recombinamer
gDNA: DNA genómico
h: horas
HPLC: High Performance Liquid Chromatography
Kb: kilopares de bases
MCS: multiple cloning site
ON: overnight
PCR: polymerase chain reaction
pDNA: DNA plasmídico
T_m: temperatura de melting
T_t: temperatura de transición

1.- RESUMEN

La bacteria *Escherichia coli* es el huésped procarionte que más se ha empleado para la expresión de proteínas recombinantes.

La expresión de dichas proteínas mediante este sistema requiere el uso de vectores específicos, conocidos como plásmidos. Estos vectores son pequeñas moléculas de DNA circular que se encuentran de forma independiente al DNA cromosómico de las bacterias, y no son esenciales para su supervivencia. Gracias al potencial de la mutagénesis sitio-dirigida se pueden modificar regiones específicas de estos vectores, desde eliminar o introducir una secuencia, hasta sustituir un simple nucleótido por otro.

En el presente trabajo, mediante mutagénesis sitio-dirigida por PCR, se ha llevado a cabo el desarrollo de:

- Un nuevo plásmido de clonación con sitios de corte *Bam*HI, denominado "pDBam", basado en un plásmido previo.
- La construcción génica "pLV-LOX", que permitirá producir el entrecruzamiento de recombinámeros de tipo elastina (ELR) *in situ*.
- El sistema "pET7-TGFβ", que conectará covalentemente un péptido que simula TGFβ-1 con diversos recombinámeros.

1.- ABSTRACT

Escherichia coli bacteria is the prokaryotic host that more has been used for the expression of recombinant proteins.

The expression of these proteins through this system requires specific vectors, known as plasmids. These vectors are small molecules of circular DNA that are found as independent units, hence not integrated in the chromosomal DNA of the bacteria, and are not essential for his survival. With the potential of site-directed mutagenesis, specific regions of these vectors can be modified, removing and introducing a sequence, or replacing a single nucleotide by other one.

In this work, the following vectors have been developed by site-directed mutagenesis by PCR:

- A new cloning plasmid, with cleavage sites recognized by *Bam*HI, called "pDBam", which is based in a previous plasmid.
- The gene construction "pLV-LOX", that will allow the crosslinking reaction of elastin-like recombinamer (ELR) *in situ*.
- The "pET7-TGFβ" system, which will bound covalently a pepetide that simulates TGFβ-1 to diverse recombinamers.

2.- INTRODUCCIÓN

2.1. Ingeniería genética

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

En las últimas décadas, la ingeniería genética ha revolucionado la biología¹. El campo de la medicina es, por ejemplo, uno de los más beneficiados con el desarrollo de esta tecnología, haciendo posible un diagnóstico clínico precoz, la identificación genética de individuos, o la terapia génica.

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

La ingeniería genética también ha propiciado un gran avance en el desarrollo de nuevos biomateriales para ser empleados en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa, destacando los materiales basados en proteínas, pues su producción recombinante proporciona la capacidad de afinar el diseño de la secuencia, obteniendo las propiedades mecánicas, funcionales y miméticas de interés.

Algunos de los materiales derivados de proteínas más estudiadas son los denominados recombinámeros tipo elastina, Elastin Like Recombinamers (ELR). Estos biopolímeros describen propiedades elastoméricas e “inteligentes” y una excelente biocompatibilidad haciendo de ellos unos candidatos ideales para su empleo en Biomedicina⁵. Su característica diferenciadora es la Transición Inversa con la temperatura, determinada por la Temperatura de Transición (Tt), específica para cada recombinámero. Dicha transición es reversible y ocurre entre un estado de desorden conformacional, característico de las cadenas relativamente extendidas por debajo de su Tt en disolución acuosa, y el estado no soluble al sobrepasar esta temperatura en que las cadenas adoptan una disposición ordenada denominada espiral β (Figura 1).

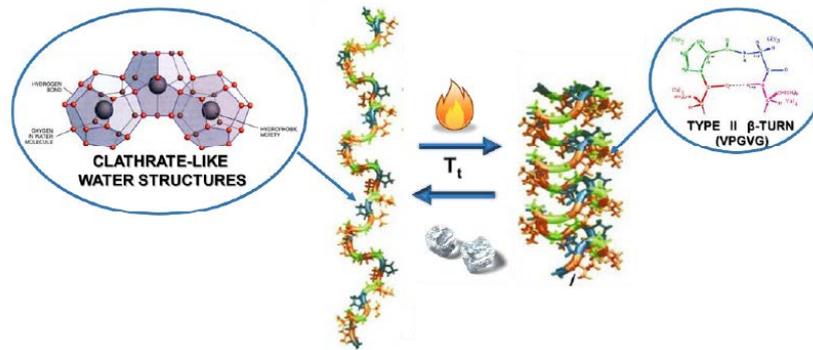


Figura 1. Representación esquemática del cambio de estructura que sufren lo ELR por encima y por debajo de su temperatura de transición (T_t)

La biosíntesis de cualquier proteína recombinante se puede esquematizar en un proceso dividido en siete pasos:

1. Diseño y construcción del gen que codifica para la proteína de interés y su inserción en un plásmido de clonación.
2. Inserción del vector en células bacterianas capacitadas para su clonación y análisis.
3. Análisis de los plásmidos introducidos en las bacterias, mediante la búsqueda del clon deseado y el control de la exactitud de la secuencia de su DNA plasmídico.
4. Transferencia del gen verificado a un plásmido de expresión que posea un ceñido control transcripcional.
5. Transformación de una cepa bacteriana de expresión con el plásmido elegido.
6. Producción de la biomasa e inducción del polipéptido recombinante.
7. Purificación de la proteína de interés.

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

2.2. Enzimas de restricción

El descubrimiento de las enzimas de restricción ha permitido a los investigadores manipular segmentos específicos de DNA, facilitando enormemente el estudio de esta molécula. Las enzimas de restricción, o endonucleasas de restricción, reconocen secuencias de bases específicas en el DNA de doble hélice y cortan ambas hebras del dúplex en lugares concretos⁶.

Las enzimas de restricción se encuentran en una gran variedad de procariontes. Su función biológica en estos organismos consiste en eliminar, mediante su actividad de endonucleasa, DNA foráneo que pudiera ingresar en ellos, como por ejemplo el de bacteriófagos.

Las enzimas de restricción reconocen secuencias específicas en el DNA de entre 4 a 8 pares de bases e hidrolizan un enlace fosfodiéster en cada hebra de la región reconocida. Una característica notable de estos sitios de corte es que en muchos casos son palíndromos y están dispuestos simétricamente.

Los cortes con estas enzimas pueden ocurrir en el mismo punto de ambas hebras de DNA, dejando lo que se conoce como extremos “romos”, con DNA doble cadena, o pueden obtenerse extremos “cohesivos” si el corte ocurre corrido en una hebra respecto la otra, dejando en este caso un fragmento de hebra simple (Figura 2).

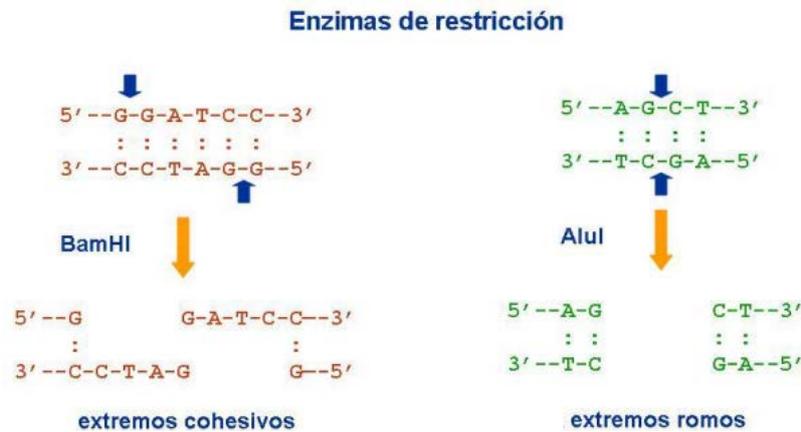


Figura 2. Ejemplo de cortes de restricción generando extremos “romos” y “cohesivos”.

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

2.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En 1984, Kary Mullis ideó un ingenioso método para amplificar secuencias específicas de DNA que se denomina Reacción en Cadena de la Polimerasa (polymerase chain reaction, PCR). Mediante esta técnica se puede amplificar un segmento específico de DNA *in vitro* hasta millones de veces en pocas horas, si se conocen las secuencias colindantes (flanqueantes) a esta secuencia blanco.

En general, la PCR se lleva a cabo agregando:

- DNA que contiene la secuencia a amplificar.
- Oligonucleótidos “forward” y “reverse” (de entre 20 y 30 nucleótidos) que actúan como cebadores (o primers) uniéndose específicamente a las secuencias colindantes del blanco.
- Los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs).
- Buffer de pH en el rango de 7,4.
- DNA polimerasa estable al calor (termoestable).

En aplicaciones como la PCR el uso de polimerasas con actividad correctora de errores ó proofreading mejora ampliamente los resultados. En la mayoría de las DNA polimerasas existe un dominio exonucleasa proofreading 3’→5’, permitiendo a la enzima comprobar cada nucleótido durante la síntesis del DNA y eliminar los nucleótidos mal emparejados.

Cada ciclo de replicación consiste en tres pasos:

1. Desnaturalización de la doble hélice de DNA (desnaturalización). Las dos hebras de la molécula de DNA original se separan mediante calentamiento de la solución.

2. Hibridación de los cebadores. La solución se enfría rápidamente a una temperatura de entre 55-60°C, que es generalmente la temperatura a la cual cada cebador se une con una hebra de DNA desapareada. No se forma nuevamente el DNA doble hebra inicial porque los cebadores están presentes en exceso.
3. Síntesis de DNA (elongación). A continuación la mezcla se calienta (en torno a 72°C). La DNA polimerasa termoestable tiene una temperatura óptima de actividad alrededor de 70°C, y se encarga de catalizar la elongación de ambos cebadores copiando la secuencia molde.

Cada ciclo de PCR duplica la cantidad de DNA, por lo que finalmente se produce un aumento de 2^n de la cantidad de DNA original siendo n el número de ciclos que se llevan a cabo. La amplificación es de un millón de veces después de 20 ciclos y de mil millones de veces después de 30 ciclos.

La PCR es una herramienta muy potente a la hora de amplificar un único fragmento de interés, y no otros, debido a la especificidad de la hibridación de los cebadores a sus secuencias complementarias a temperaturas de 55-60°C. La temperatura y las concentraciones salinas pueden condicionar dicha especificidad. De este modo, a altas temperaturas y altas concentraciones salinas (condiciones de alta rigurosidad) los cebadores solamente hibridan con secuencias totalmente complementarias y se amplifica un único fragmento; en cambio, si disminuye la temperatura a 45-50°C, o las concentraciones salinas (condiciones de baja rigurosidad), los cebadores comienzan a hibridar con secuencias que no son totalmente complementarias sino que tienen variaciones en algunas pares de bases, surgiendo así la posibilidad de la mutagénesis sitio-dirigida.

2.3.1 Mutagénesis sitio-dirigida

La mutagénesis sitio-dirigida, también llamada simplemente mutagénesis dirigida, es una técnica de biología molecular utilizada para crear mutaciones puntuales en una cadena de DNA⁷.

El proceso, en primer lugar, requiere sintetizar un fragmento corto de DNA, el cebador o primer, que contenga la mutación deseada. El cebador debe hibridar mayoritariamente con la molécula monocatenaria de DNA que contiene la secuencia de interés. Utilizando una DNA polimerasa se elonga la cadena a partir del primer, incorporando así la mutación al DNA.

Esta técnica no solo hace posible crear mutaciones puntuales en una molécula de DNA, sino que también permite producir deleciones e inserciones. Esto se consigue modificando el cebador para controlar el tipo de mutación que se pretende realizar en el DNA. La única condición que debe cumplir es que mantenga cierta capacidad de unión con la cadena de DNA molde, pues disminuyendo la temperatura de hibridación a 45-50°C, unos valores por debajo de los habituales, se favorece la hibridación deseada.

Este tipo de mutagénesis tiene dos variantes:

-Empleando cebadores complementarios. Los primers “forward” y “reverse” parten del mismo punto, originando una amplificación del plásmido entero con una mutación en una única región (Figura 3).

-Empleando oligonucleótidos con secuencias no complementarias. Los primers se

alinean donde les corresponde, originando, tras la amplificación, un fragmento que puede poseer una mutación en cada uno de sus extremos (Figura 4).

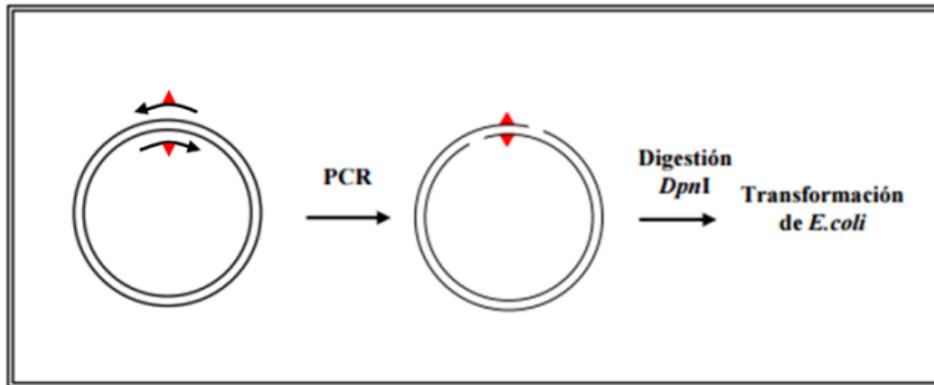


Figura 3. Mutagénesis con primers complementarios (mutación en rojo).

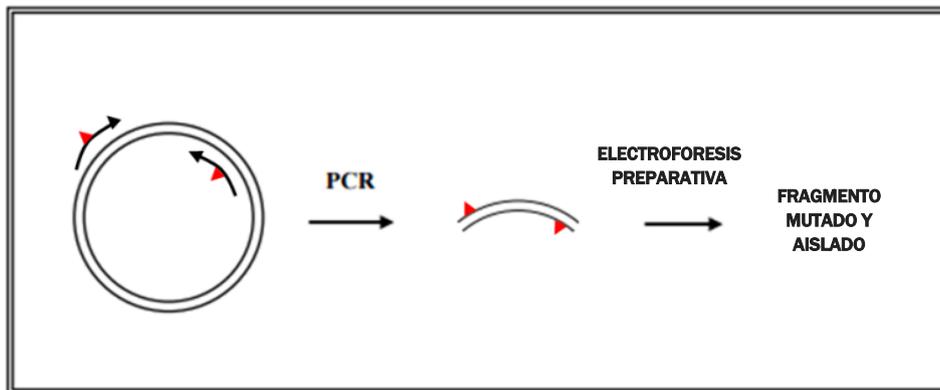


Figura 4. Mutagénesis con primers no complementarios (mutaciones en rojo).

2.4. Clonación de DNA

Un fragmento de DNA obtenido a partir de un organismo (DNA foráneo) es insertado en un vector (molécula de DNA) y la quimera así obtenida (DNA recombinante) es usada para transformar células hospedadoras. A medida que la célula hospedadora se divide, además de replicar su propio DNA, también replica el DNA del vector, el cual incluye el DNA foráneo. El proceso mediante el cual se introduce un vector a una bacteria se denomina transformación (Figura 5). Si se introduce un vector a una célula eucarionte este proceso es denominado transfección.

Si las células hospedadoras son bacterias, el primer paso en el procedimiento de clonación es insertar el DNA foráneo dentro de un vector que pueda transportar este DNA dentro de la bacteria.

Los vectores más comúnmente usados son plásmidos. Estos plásmidos son macromoléculas extra-cromosómicas de DNA circular, mayoritariamente, y de doble hélice, que se caracterizan por su capacidad para replicarse de manera independiente del DNA genómico. A diferencia de éste, los plásmidos no son necesarios para la viabilidad de la célula; sin embargo, algunos contienen genes que resultan útiles para la célula hospedadora (como los que confieren resistencia a antibióticos).

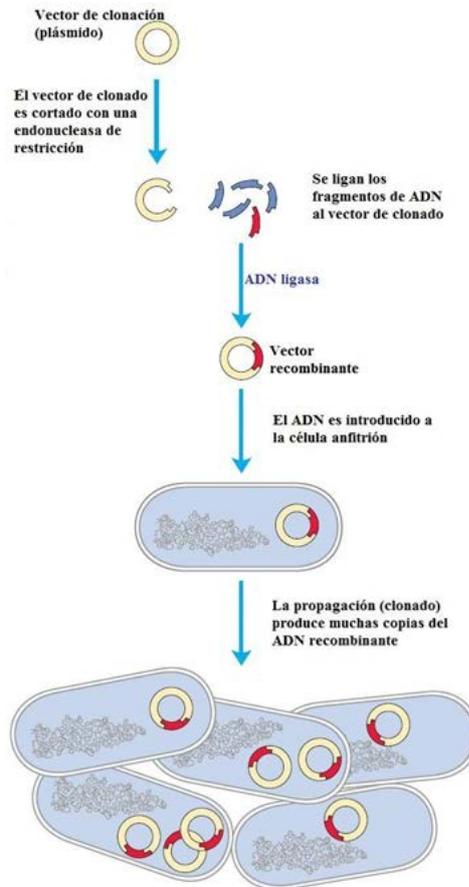


Figura 5. Representación esquemática de la clonación de DNA.

Normalmente los plásmidos se encuentran en bacterias y en algunas ocasiones en organismos eucariotas. Cada plásmido tiene, por lo menos, una secuencia de DNA que sirve como origen de replicación, es decir, un punto de partida para la réplica del DNA, que permite al plásmido duplicarse independientemente del gDNA. Estos vectores poseen un tamaño pequeño, lo que facilita su entrada a la bacteria: 1 - 250 Kb, conteniendo de 2 a 30 genes.

Dentro de este tipo de moléculas de DNA, podemos diferenciar los plásmidos de clonación, que carecen de elementos promotores y reguladores, y los plásmidos de expresión, que son aquellos que sí que contienen estos elementos promotores y reguladores, generando grandes cantidades de mRNA asociado a las secuencias del DNA recombinante introducido y que, finalmente, son traducidos a proteína por la maquinaria bioquímica de la bacteria⁸. Por regla general, los plásmidos de expresión presentan un número bajo de copias por célula, mientras que los plásmidos de clonación suelen estar presentes como varias copias dentro de la célula, lo que facilita enormemente su aislamiento y purificación.

Los plásmidos, de forma general, exhiben tres elementos característicos en su conformación más básica (Figura 6):

- El "polylinker" ó MCS (multiple cloning site), región con sitios de restricción únicos que se pueden utilizar para la inserción del gen de interés.
- El gen de resistencia a un determinado antibiótico.
- El origen de replicación bacteriana (ori): región esencial que contiene los genes involucrados en la replicación y su control.

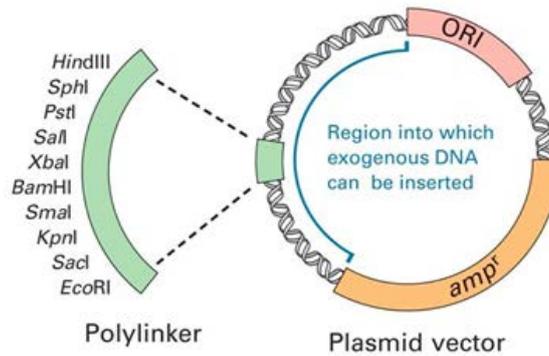


Figura 6. Representación esquemática de un plásmido modelo.

El DNA plásmido puede aparecer en varias conformaciones⁹, las cuales (para un tamaño dado) corren a diferentes velocidades en un gel durante la electroforesis.

Las conformaciones más habituales, en orden de movilidad electroforética (velocidad para un voltaje dado), de la más lenta a la más rápida (Figura 7), son:

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

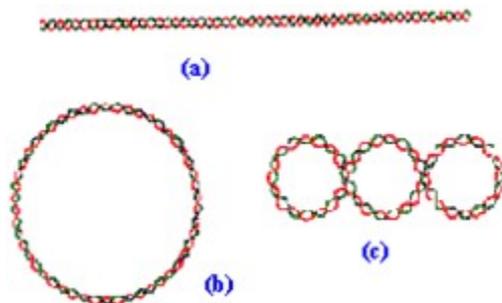


Figura 7. Conformaciones espaciales: (a) lineal, (b) circular relajada, (c) superenrollada.

Estos plásmidos han sido modificados mediante ingeniería genética a lo largo de los años, y actualmente existe una gran selección comercial de los mismos para distintos propósitos. Aun así, a veces, es necesario realizar variaciones en la secuencia genética de estos vectores comerciales para satisfacer nuevas demandas. Es aquí donde se ubica el presente Trabajo Fin de Máster.

3.- OBJETIVOS

Existe una amplia variedad de plásmidos comerciales con una gran diversidad genética. No obstante, nuevas ideas y posibilidades surgen continuamente, y no hay disponible una variedad infinita de plásmidos construidos.

El objetivo general de este trabajo es la creación y adaptación de nuevas plataformas plasmídicas, facilitando el trabajo con los genes de interés. Los objetivos específicos son el desarrollo de tres construcciones génicas:

- “**pDBam**”: Este nuevo plásmido de clonación basado en un vector previo, permite transportar fácilmente un determinado gen de ELR al vector lentiviral “pLV” gracias a los nuevos sitios de corte reconocidos por *Bam*HI.
- “**pLV-LOX**”: Está construcción permitirá la transfección estable de células eucariotas mediante lentivirus para la sobreexpresión del gen LOX, que codifica para la enzima Lisil oxidasa, cuya función es producir el entrecruzamiento de aminoácidos de lisina en la elastina natural. Esta función será extrapolable, en su aplicación final, al entrecruzamiento de recombinámeros de tipo elastina (ELRs).
- “**pET7-TGFβ**”: En esta construcción, la secuencia TGFβ, codificante para un pequeño péptido que simula el dominio de unión de la citoquina TGF-β1, queda dispuesta para ser ligada a un ELR que pueda ser utilizado en aplicaciones biomédicas.

4.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

4.1.1. Materiales de biología molecular

4.1.1.1. Enzimas de restricción

*Bam*HI, *Dpn*I, *Ssp*I, *Xba*I, *Nde*I (Thermo Fisher).

Todas las enzimas se emplean de acuerdo a las guías de uso.

4.1.1.2. Otras enzimas

T4 DNA Ligase, FastAP Phosphatase, Phusion High-Fidelity DNA polymerase, Phusion Hot Start II DNA Polymerase, Shrimp alkaline phosphatase (SAP): Thermo Fisher. *PfuTurbo* DNA polymerase, Herculasa II Phusion DNA polymerase: Agilent Technologies.

Todas las enzimas son empleadas de acuerdo al protocolo.

4.1.1.3. Cepas bacterianas

Cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) utilizadas en el trabajo:

-XL-1 Blue Competent Grade (Stratagene, Eficiencia (cfu/μg de pUC18 DNA) $\geq 10^8$), para ligaciones de DNA y productos de PCR.

-XL-1 Blue Subcloning Grade (Stratagene, Eficiencia (cfu/μg de pUC18 DNA) $\geq 10^6$), para los subclonajes.

Genotipo XL-1 Blue: endA1 supE44 hsdR17 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacIq ΔM15 Tn10 (Tetr)]

4.1.1.4. Medios de cultivo

Medios empleados en el crecimiento bacteriano:

-Luria-Bertani (LB): 25 g/L (Pronadisa).

-LB-agar (placas de cultivo): medio LB (25 g/L) con un 1,5% (p/v) agar (Fluka). Se esteriliza en autoclave. Suplementado con glucosa al 1% y antibiótico correspondiente a la concentración de uso.

Medio empleado en las transformaciones bacterianas:

-SOC Broth (Sigma Aldrich).

4.1.1.5. Vectores plasmídicos

Las plataformas vectoriales utilizadas en este trabajo han sido:

-Vector de expresión pET7, construido previamente en este mismo laboratorio a partir del vector pET-25b (+) de Novagen, por la Dra. A. Girotti¹⁰.

-Vector lentiviral pLV: sintetizado por VectorBuilder.

-Vector de clonación pUC57 incluyendo el gen "LOX": sintetizado por GenScript.

-Vector de clonación pDA11, modificado por este grupo a partir del vector pDrive de Qiagen, por el Dr. A. Ribeiro¹¹.

4.1.1.6. Kits de extracción y purificación de DNA

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

4.1.2. Primers

Códigos utilizados: A = adenosina, C = citosina, G = guanosina, T = timina.

A continuación se enumeran los cebadores que han sido diseñados para realizar las mutaciones pertinentes, empleando la reacción en cadena de la polimerasa (Tabla 1). Se describe la secuencia y la temperatura de fusión (T_m). La T_m expuesta no tiene en cuenta las mutaciones específicas.

Todos ellos fueron sintetizados por la compañía Metabion International AG con un grado de pureza HPLC. Se han diseñado los cebadores intentando minimizar los cambios de la secuencia nucleotídica original.

Mutagénesis	Nombre del Primer	Secuencia (5' → 3')	T _m (°C)
Cebadores sin secuencias complementarias	LOX-BamFor	TCT g GAT cc GCTTATGCGCTTCGCCTGGACC	78
	LOX-BamRev	GAT g AT cc CaAATACGGTGAAATTGTGCAGCCTGAG	77
Cebadores con secuencias complementarias	pETSTOPBamFor	GATATCGCTCTTCAGTAG g GATCCGAATTCGAGCTC	75
	pETSTOPBamRev	GAGCTCGAATTCGAT cc TACTGAAGAGCGATATC	75
	pETMetBamFor	AAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGG Atcc ATACATATGGAATCCCTGCTGCCGGTAG	82
	pETMetBamRev	CTACCGGCAGCAGGGATTCCATATGTAT gga TCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTT	82
	TGF1For	CATATGGAATCC cc GCTGC aa GTAGGAAGAGCTGG	78
	TGF1Rev	CCAGCTCTTCTACT tt GCAGCG gg GATTCCATATG	78
	TGFB1For	CATATGGAATCC cc GCT gaagag GCAAGTAGGAAGAGCTG	80
	TGFB1Rev	CAGCTCTTCTACTTGC ctcttc AGCGGGGATTCCATATG	80

Tabla 1. Lista de primers empleados en las distintas mutagénesis y las mutaciones que contienen (en minúscula y en negrita).

4.2. Métodos

4.2.1. Electroforesis de DNA en gel de agarosa

La electroforesis 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 obtenidos en una reacción de PCR. Según el tamaño de los fragmentos de DNA de la muestra, se emplean geles a distintas concentraciones en tampones TAE 1X (Tabla 2).

Tamaño del fragmento (bp)	Concentración final de agarosa (% p/V)
800-10000	0.8
400-8000	1
300-7000	1.2
200-4000	1.5
100-2000	2

Tabla 2. Resolución para DNA lineal asociado a diferentes concentraciones del gel de agarosa.

Las muestras se cargan añadiendo loading buffer 5X hasta alcanzar una concentración final 1X. La electroforesis se lleva a cabo con un voltaje fijo, comprendido entre 2 y 7 V/cm, según se trate de una electroforesis analítica o preparativa. La electroforesis se monitoriza atendiendo a lo que hayan recorrido los colorantes de referencia, deteniéndolo cuando dichos colorantes se encuentren en la posición del gel adecuada.

Finalmente, el gel se tiñe entre 10 y 30 minutos en una solución 1X GelRed™ (Biotium). Las bandas de DNA se visualizan en un transiluminador de luz UV Vilber Lourmat, modelo TFX-20 M. Como patrón de tamaño se emplea el marcador DNA 1kb Plus Ladder (Invitrogen). La determinación del tamaño relativo de los fragmentos de DNA se hizo mediante el software "Kodak 1D Image Analysis" de Kodak.

4.2.2. Purificación de plásmidos

Los vectores utilizados en este trabajo fueron purificados usando sistemas mencionados anteriormente (4.1.1.6), *NucleoSpin Plasmid* (Macherey-Nagel) y *Quantum Prep Plasmid Midiprep Kit* (Bio-Rad), siguiendo el protocolo establecido por las casas comerciales. El DNA eluido es cuantificado y evaluada su pureza mediante Nanodrop 2000c Spectrophotometer de Thermo Scientific. Si a continuación no es empleado, se almacena a -20°C.

4.2.3. Digestión del DNA con enzimas de restricción

Las reacciones de restricción se llevan a cabo en las condiciones indicadas por la casa comercial que suministre la enzima (temperatura, concentración, tiempo de reacción, tampón de reacción utilizado, variaciones en las dobles digestiones, etc.). El alcance de la digestión se controla mediante electroforesis de DNA.

4.2.4. Defosforilación del DNA

La reacción de defosforilación se realiza bajo las condiciones indicadas por las casas comerciales que suministran las enzimas (temperatura, tiempo de reacción, buffer, inactivación, etc.). Es necesaria la inactivación posterior de las enzimas, para evitar su acción sobre los genes a insertar cuando éstos son añadidos.

En la defosforilación del plásmido pLV se han tenido que utilizar consecutivamente 2 enzimas fosfatasas distintas (FastAP y SAP) y aumentar los tiempos de incubación a una hora para evitar la recirculación del plásmido lineal.

4.2.5. Purificación de fragmentos de DNA extraídos de gel de agarosa

En electroforesis preparativas, la banda de DNA de interés inicialmente es separada y visualizada en un gel de agarosa de concentración apropiada y teñido con GelRed™ (según se indicó en 4.2.1). Posteriormente, se escinde con una cuchilla, procurando extraer la mínima cantidad posible de agarosa. La purificación del fragmento se ha llevado a cabo mediante el sistema antes mencionado (4.1.1.6) *PureLink Quick Gel Extraction Kit* (Life Technologies).

4.2.6. Reacción de ligación

Las ligaciones se realizan en un volumen total de 15 µL, mezclando el inserto y el vector en una proporción molar desde 1:1 hasta 5:1, y añadiendo T4 DNA ligasa, suplementada con su buffer correspondiente, atendiendo a las especificaciones propias del protocolo. La reacción se mantiene a temperatura ambiente durante una hora a 16°C, o bien, a 4°C durante 16-24 horas. No es necesaria la inactivación de la enzima, siendo almacenable la reacción de ligación a -20°C hasta su uso.

4.2.7. Mutagénesis sitio-dirigida

La mutagénesis se basa en la extensión enzimática por PCR de dos cebadores que incluyen, dentro de sus secuencias, las mutaciones deseadas. Se utiliza como molde el DNA plasmídico que se debe mutar. Las DNA polimerasas empleadas son específicas para PCR high-fidelity:

- PfuTurbo* (2.5 U/ μ L): versión mejorada de la *Pfu*.
- Herculasa II Phusion: versión mejorada de la *Pfu* para targets ricos en nucleótidos GC
- Phusion High-Fidelity (2 U/ μ L), tasa de error 6 veces inferior a la de *Pfu*.
- Phusion Hot Start II (2 U/ μ L), posee un ligando Affibody específico unido reversiblemente que inhibe la actividad de la DNA polimerasa a temperatura ambiente.

Las condiciones de la reacción de amplificación, esto es, las temperaturas y tiempos de desnaturalización, hibridación y elongación, así como el número de ciclos, fueron modificadas según los requisitos de cada amplificación. Siendo importante volver a destacar la necesidad de disminuir la temperatura de hibridación a valores de 45-50°C, para asegurar el anillamiento de los cebadores al DNA molde.

Se realizan Master Mix para minimizar los posibles errores de pipeteo. Composición típica de un microtubo de muestra de reacción:

- X μ L de Buffer de Reacción (hasta alcanzar una concentración 1x)
- X μ L de DNA plasmídico (50 ng)
- X μ L de oligonucleótido forward (125 ng)
- X μ L de oligonucleótido reverse (125 ng)
- 1 μ L del mix dNTP 25mM
- X μ L de Agua libre de nucleasas (hasta 50 μ L)
- 1 μ L de DNA polimerasa

4.2.7.1. Mutagénesis con cebadores complementarios

Se utilizan los primers de secuencia complementaria (“forward” y “reverse”) antes indicados (4.1.2), tomando como base experimental (condiciones de la PCR), las indicaciones proporcionadas en el protocolo de mutagénesis de Stratagene (“Quick Change Site-directed Mutagenesis Kit”, Figura 8).

Una vez amplificado, se evalúa por electroforesis analítica en gel de agarosa la existencia de banda de amplificado. Posteriormente, se incuba con una endonucleasa (*DpnI*, siguiendo las especificaciones) que digiere exclusivamente el DNA metilado del plásmido molde (secuencia diana: 5´-Gm⁶ATC-3´). Se realiza directamente una transformación en XL1-Blue Competent Cells con el producto de la reacción. En el interior de las células bacterianas, los plásmidos lineales mutados se cierran, y adquieren la correcta conformación mediante la asistencia de los sistemas de reparación celular presentes en las bacterias.

4.2.7.2. Mutagénesis con cebadores no complementarios

Se utilizan los primers con secuencia no complementaria (“forward” y “reverse”) antes indicados (4.1.2). En este caso el amplificado se corresponde con el fragmento de DNA que delimitan los primers (que ya contienen la mutación).

Una vez evaluada la existencia de banda de amplificado por electroforesis analítica, en gel de agarosa, se aísla y purifica realizando una electroforesis preparativa (4.2.5).

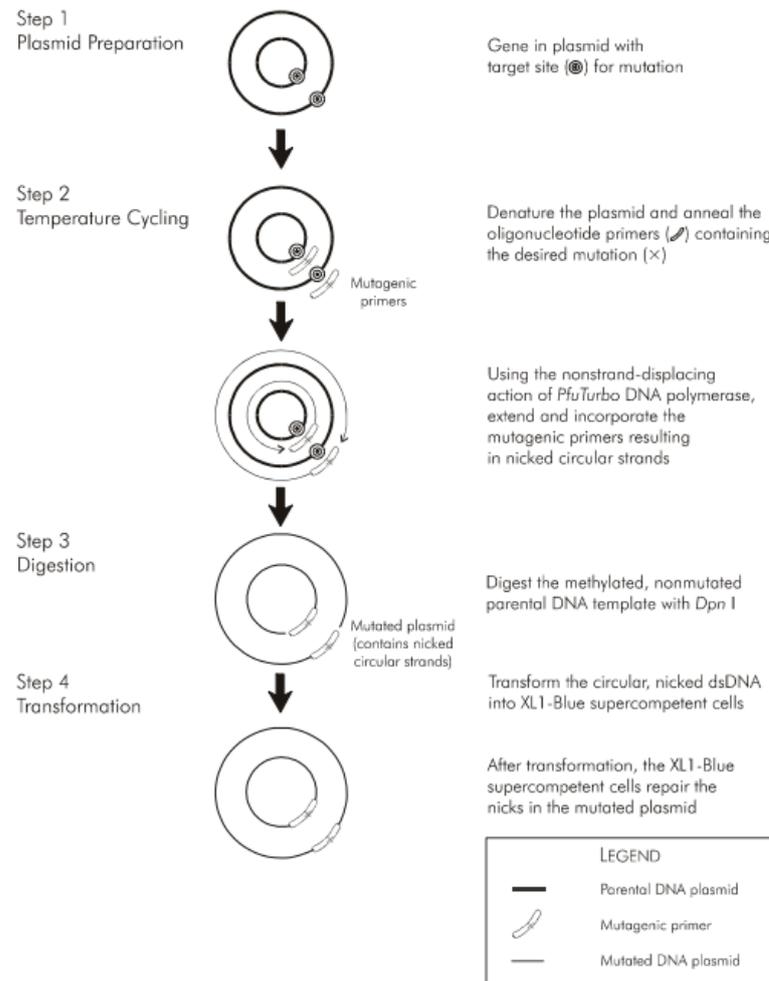


Figura 8. Esquema del método de mutagénesis sitio-dirigida QuikChange®

4.2.8. Transformación de las cepas XL-1 Blue.

Se emplean alícuotas almacenadas a -80°C . Se descongelan en hielo en el momento de su uso. La transformación en estas cepas bacterianas se realiza siguiendo el protocolo especificado por el suministrador.

La siembra se lleva a cabo en placas de cultivo (4.1.1.4) con el correspondiente antibiótico, incubándose a 37°C hasta la observación de colonias aisladas (16 - 21 h). Una vez crecidas las colonias aisladas, son seleccionadas y picadas en campana de flujo laminar, llevándose a un falcon con medio LB, suplementado con el antibiótico correspondiente. Estos falcon se incuban a 37°C , con agitación orbital (250rpm), hasta la observación de turbidez, indicando crecimiento bacteriano (16 - 21 h).

4.2.9. Secuenciación de DNA

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

5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Desarrollo de la construcción génica “pLV-LOX”

Para producir el entrecruzamiento de los ELR, se puede realizar una funcionalización previa, con grupos azida y alquinos terminales, así mediante la llamada Química “click”¹², se genera la unión covalente. No obstante, en la naturaleza, el entrecruzamiento de polímeros proteicos que poseen aminoácidos de lisina como la elastina y el colágeno, se produce directamente bajo el efecto de la enzima Lisil oxidasa¹³ (LOX).

El plásmido “pLV-LOX” formará parte de un sistema de transfección vírico. Lo que se pretende es generar un lentivirus con dicho plásmido para la transfección estable de células eucariontes. Al inyectar ELR junto a células ya transfectadas (conteniendo pLV-LOX) se producirá el entrecruzamiento *in vivo* de los recombinámeros, al secretar la enzima LOX.

En el plásmido “pLV-Luc” utilizado en este trabajo, los genes de interés se expresan bajo el control del promotor constitutivo EF1a.

5.1.1. Generación simultánea de dos sitios *Bam*HI flanqueando el gen LOX.

En la Figura 9 izquierda se muestra la posición relativa donde se originaron las secuencias de corte *Bam*HI. De esta forma se podrá extraer el gen LOX dejando extremos cohesivos complementarios a los que se generan en el pLV-Luc al digerirlo con la misma enzima.

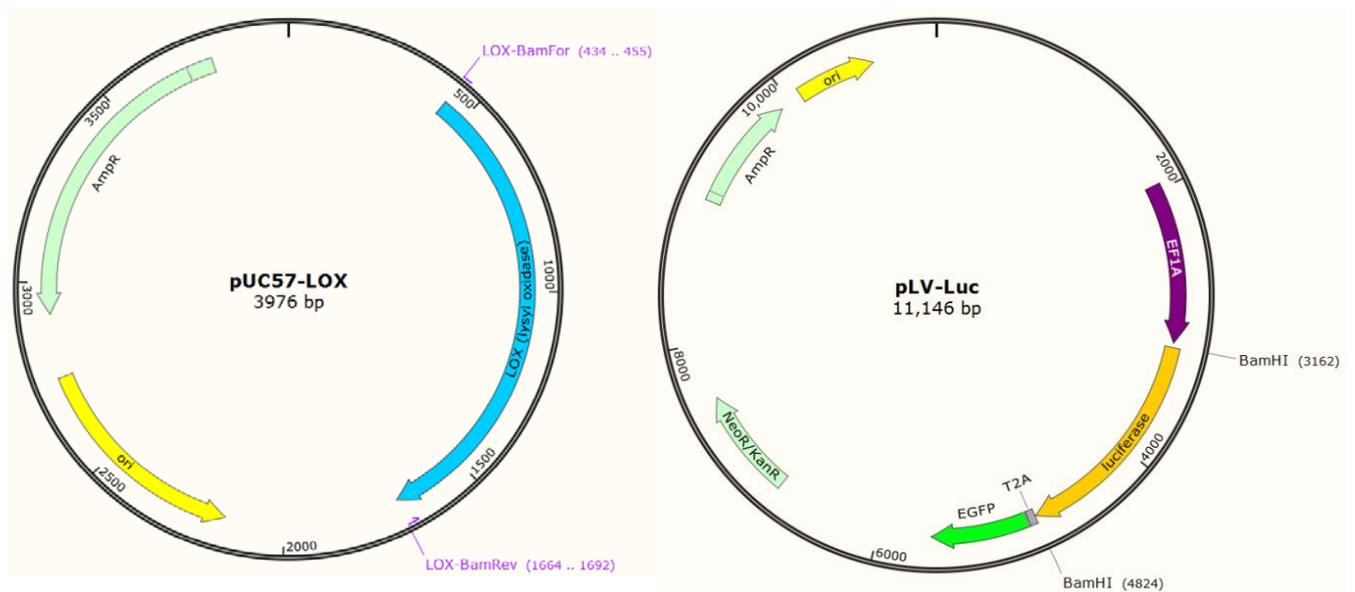


Figura 9. Representación de los principales dominios del plásmido pUC57-LOX y pLV-Luc, y la posición (en bp) de la hibridación de los cebadores (en morado) y de los sitios de reconocimiento de la enzima de restricción *Bam*HI, respectivamente.

Las condiciones de esta amplificación por PCR están basadas en estudios anteriores del laboratorio.

Condiciones de la PCR:	Desnaturalización inicial	95°C: 5'	} 25 ciclos
	Desnaturalización	95°C: 45''	
	Hibridación	50°C: 45''	
	Elongación	68°C: 1' 30''	
	Elongación final	72°C: 15'	
	Conservación	15°C	

Como se aprecia en la Figura 10, calles 1 y 2, la amplificación con la pareja de cebadores (de secuencia no complementaria) LOXBamFor y LOXBamRev y la polimerasa *PfuTurbo*, determinaron la formación de una banda de tamaño correspondiente al fragmento del gen LOX (1276 bp) comprendido entre los extremos de los dos primers, conteniendo las dos mutaciones deseadas. En la calle 4 se puede apreciar el plásmido en conformación de DNA superenrollado, con una mayor movilidad electroforética.

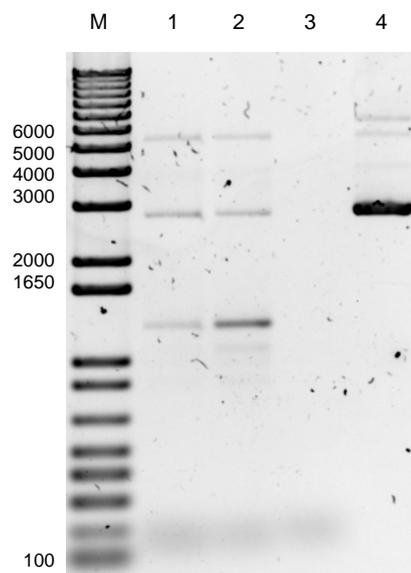


Figura 10. Foto de electroforesis de DNA en gel de agarosa al 0.8%. M = marcador 1kb Plus, 1 y 2 = producto de la PCR con la polimerasa *PfuTurbo*, 3 = control negativo sin pDNA molde, 4 = plásmido pUC57-LOX usado como molde.

El primer LOX-BamRev, además de generar un nuevo sitio de corte *Bam*HI (CCTAGG), elimina el codón de parada (TAG) de LOX (Figura 11).

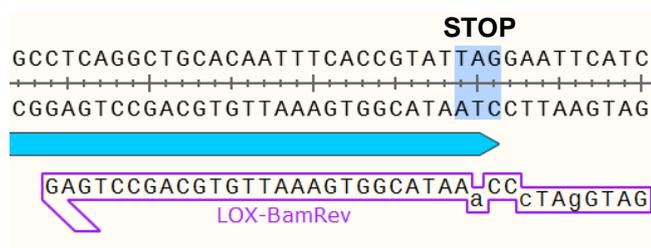


Figura 11. Secuencia nucleotídica del extremo 3' del gen LOX (azul) y del cebador LOX-BamRev (mutaciones en minúscula)

5.1.2. Sustitución del gen Luciferasa del plásmido pLV-Luc por el nuevo gen LOX.

Se realizó una digestión con la enzima de restricción *Bam*HI tanto del plásmido pLV-Luc como del producto de PCR (el fragmento del gen LOX amplificado de 1276 bp). El resultado fueron los siguientes fragmentos de DNA:

- pLV: 1662 bp (gen Luciferasa) + 9484 bp (fragmento de interés, pDNA).
- Fragmento amplificado: 1264 bp (gen LOX, fragmento de interés) + 8 bp + 4 bp.

Se aislaron y purificaron los fragmentos de DNA de interés, siguiendo el procedimiento descrito en el punto 4.2.5.

Empleando la enzima T4 DNA ligasa, se llevó a cabo la reacción de ligación de los fragmentos de DNA de interés: el gen LOX (1264 bp) y el plásmido pLV abierto (9484 bp). En este caso, es necesario un paso previo de defosforilación del plásmido abierto pLV, porque los extremos resultantes son cohesivos habiendo posibilidad de recircularización del vector. El gen LOX y el plásmido pLV abierto son añadidos en una proporción molar 4:1, respectivamente.

El plásmido resultante de la ligación es la denominada construcción pLV-LOX, de 10748 bp (9484 bp + 1264 bp). Los plásmidos recién formados fueron usados para transformar en XL1-Blue Competent Cells. El análisis de los clones transformantes mediante digestión diagnóstica del DNA plasmídico con las enzimas *Xba*I y *Bam*HI, permite reconocer los clones positivos que contienen el gen LOX y la secuencia con el sentido correcto. Ambos extremos del gen LOX y del plásmido pLV abierto contenían secuencias de corte *Bam*HI, provocando (por probabilidad estadística) que la inserción del gen se produjese en los dos sentidos (Figura 12).

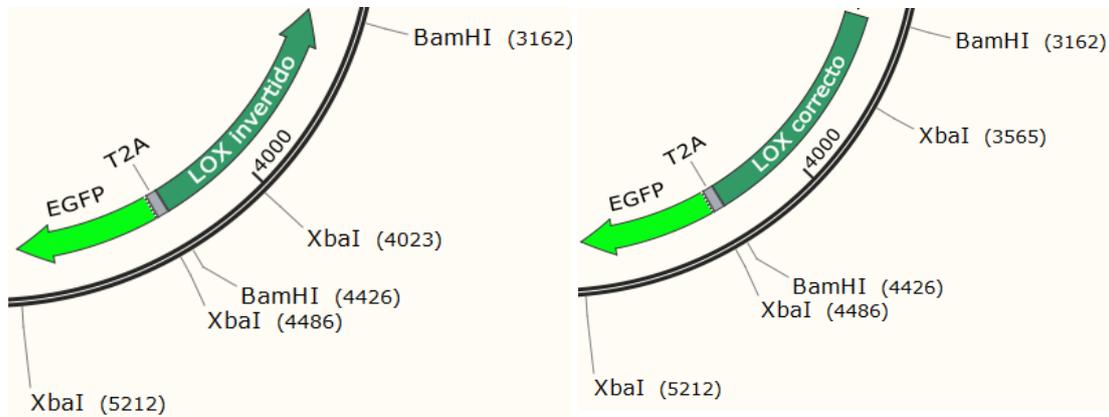


Figura 12. Esquema de las dos posibles formas de inserción del gen LOX.

La digestión de los plásmidos con *Bam*HI libera el gen LOX insertado, observando una banda de 1264 bp; la digestión con *Xba*I genera un patrón de bandas diferente en función del sentido de la inserción (Figura 13):

- Inserción de LOX correcta: 9101 bp + 921 bp + 726 bp
- Inserción de LOX invertida: 9559 bp + 726 bp + 436 bp

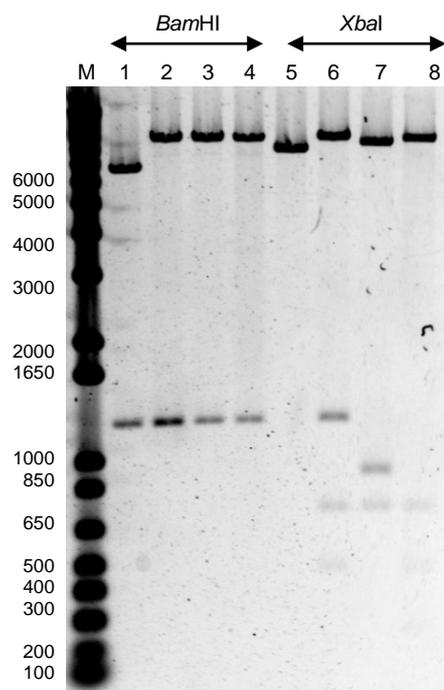


Figura 13. Foto de electroforesis de DNA en gel de agarosa al 1%. M = marcador 1kb Plus; **BamHI**: 1 = clon 1, 2 = clon 2, 3 = clon 3, 4 = clon 4; **XbaI**: 5 = clon 1, 6 = clon 2, 7 = clon 3, 8 = clon 4.

Clon 1: el vector con *XbaI* y *BamHI* no se ajusta a ningún patrón de bandas esperado. Clones 2 y 4: el vector con *BamHI* se ajusta al patrón esperado; el vector con *XbaI* se ajusta al patrón esperado para la inserción de LOX invertida (la banda de 1162 bp de la calle 6 es una digestión parcial que produciría los fragmentos 726 bp + 436 bp). Clon 3: el vector digerido con *XbaI* y *BamHI* se ajusta a los patrones de bandas esperados.

El vector del clon 3 fue controlado mediante secuenciación del gen LOX y las zonas proximales, comprobando que el plásmido resultante poseía todos los elementos de la construcción (Figura 14).

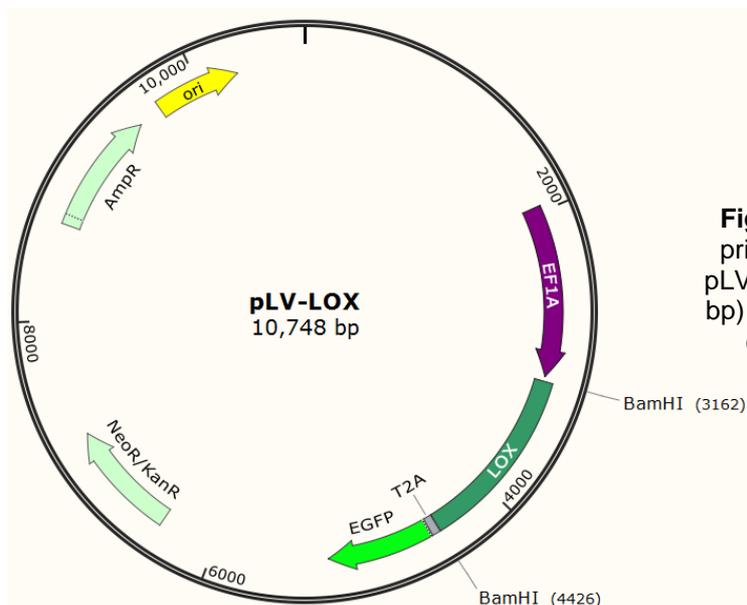


Figura 14. Representación de los principales dominios del plásmido pLV-LOX, mostrando la posición (en bp) del sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *BamHI*.

5.2. Construcción de la nueva plataforma plasmídica “pDBam”

Para que las células eucariotas produzcan proteínas recombinantes, es necesario un proceso previo de transfección, introduciendo material genético externo, mediante vectores. Entre los distintos sistemas disponibles, los lentivirus son uno de los más potentes, siendo necesario, el empleo de un plásmido que contenga el gen de interés y que se empacete en el interior de las partículas víricas.

El desarrollo de esta plataforma “pDBam” tiene como fin servir de medio, preparando un gen de interés para su posterior inserción en el plásmido lentiviral “pLV-Luc”.

Los nuevos sitios de corte *Bam*HI generados, quedan adyacentes a los sitios *Sap*I (ya presentes previamente). Los sitios de corte *Sap*I permiten introducir insertos en el polylinker de los plásmidos bacterianos (método de clonación desarrollado en Bioforge¹⁴). De este modo, se puede clonar un inserto con *Sap*I en el nuevo plásmido pDBam, sacarlo de ahí con *Bam*HI, y posteriormente introducirlo en el pLV abierto con la misma enzima.

5.2.1. Mutagénesis sitio-dirigida sobre el “polylinker” del vector de expresión pET7. Generación del sitio *Bam*HI 3’.

En la Figura 15 se muestra la posición relativa donde se originó la primera secuencia de corte *Bam*HI, pudiendo así, en un siguiente paso, extraer el fragmento comprendido entre *Xba*I y la nueva secuencia *Bam*HI, para su posterior inserción en el plásmido de clonación pDAII abierto con sendas enzimas.

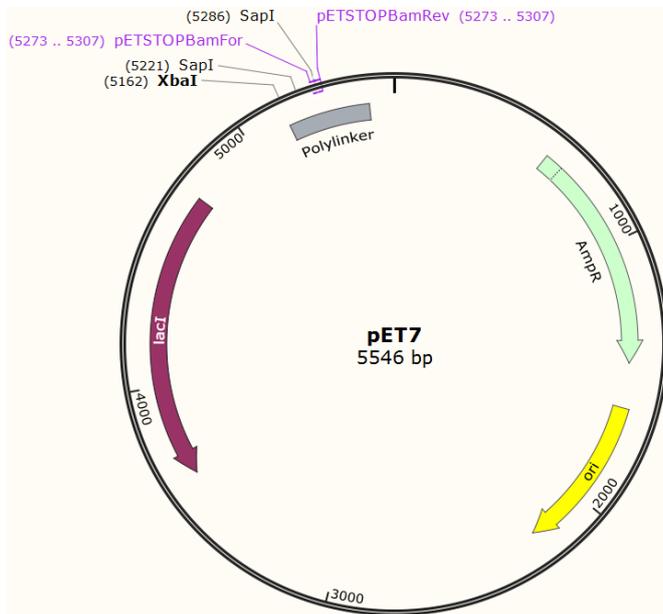


Figura 15. Representación de los principales dominios del plásmido pET7, y la posición (en bp) de la hibridación de los cebadores (en morado) y de los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción *Xba*I y *Sap*I.

Las condiciones de esta PCR son el resultado de una puesta a punto previa.

Condiciones de la PCR:	Desnaturalización inicial	95°C: 2'	} 30 ciclos
	Desnaturalización	95°C: 20''	
	Hibridación	50°C: 20''	
	Elongación	72°C: 5' 45''	
	Elongación final	72°C: 3'	
	Conservación	15°C	

Como se aprecia en la Figura 16, Panel A, calle 3, la amplificación con la pareja de cebadores (de secuencia complementaria) pETSTOPBamFor y pETSTOPBamRev y la DNA polimerasa Herculasa II Phusion, determinaron la formación de una banda de tamaño correspondiente al plásmido lineal (5546 bp) que contendrá la mutación de interés. En la calle 1 se puede apreciar nuevamente el plásmido molde en conformación superenrollado, con una mayor movilidad electroforética.

Los plásmidos recién sintetizados carecen de metilación y no son digeridos por *DpnI*. Se emplea directamente el producto de PCR digerido con *DpnI* para transformar en XL1-Blue Competent Cells. El análisis de los clones transformantes mediante digestión diagnóstica del pDNA con la enzima *Bam*HI (Figura 16, Panel B) permite reconocer los clones positivos que contienen la mutación buscada, pues se produce la linealización del plásmido (observándose una banda a 5546 bp).

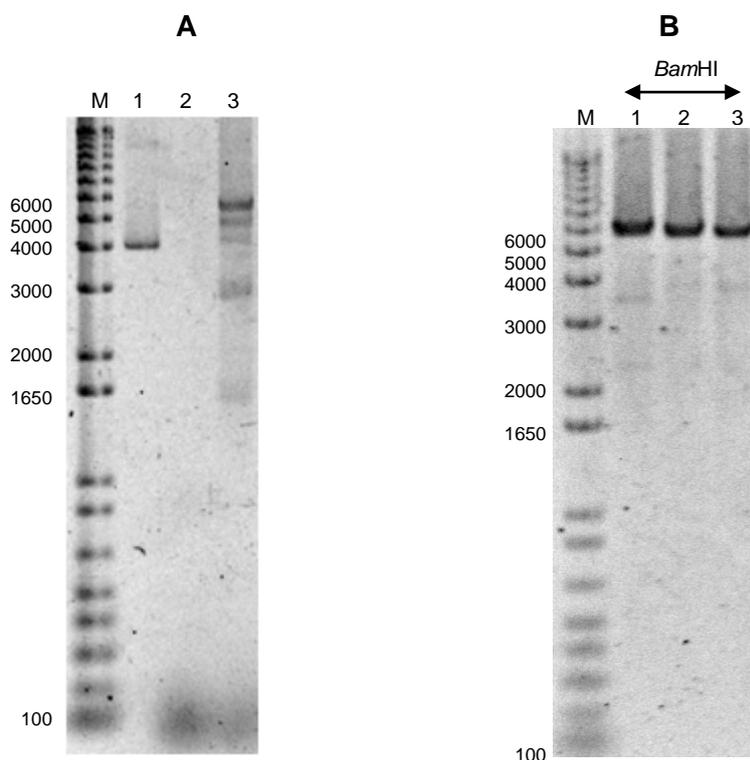


Figura 16. Foto de electroforesis de DNA en gel de agarosa al 1%.
Panel A: M = marcador 1kb Plus, 1 = plásmido pET7 usado como molde, 2 = control negativo, 3 = producto de la PCR con la polimerasa Herculasa II Phusion.
Panel B: M = marcador 1kb Plus; **Bam**HI: 1 = clon 1, 2 = clon 2, 3 = clon 3.

Los vectores mutados fueron controlados mediante secuenciación del polylinker, comprobando que el plásmido purificado a partir del clon 1 tenía la secuencia mutada. Este plásmido se eligió para realizar el siguiente paso y se denominó p7Bam.

5.2.2. Sustitución del “polylinker” del plásmido pDAII por el de p7Bam

Con la nueva secuencia de corte *Bam*HI presente en el plásmido de expresión p7Bam (Figura 17 arriba), se puede extraer el “polylinker” comprendido entre *Xba*I y *Bam*HI e insertarlo en el plásmido de clonación pDAII, cuyo polylinker también está flanqueado por ambas secuencias de corte.

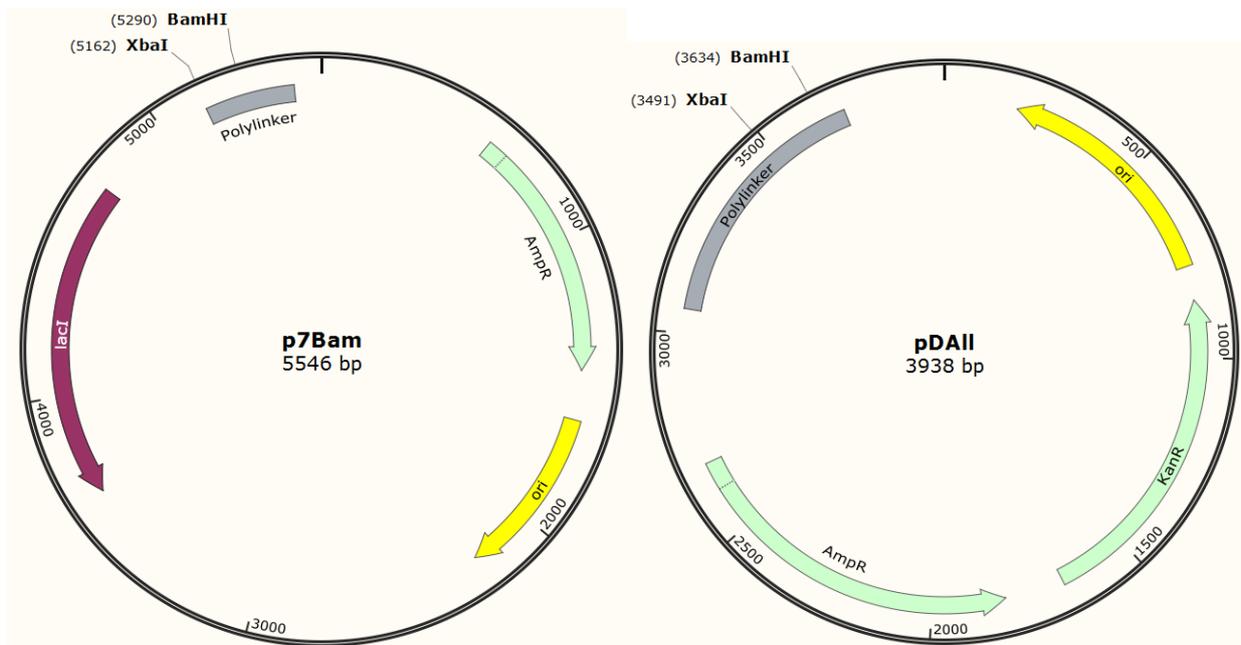


Figura 17. Representación de los principales dominios del plásmido p7Bam (izquierda) y pDA11 (derecha), mostrando en ambos, la posición, en pares de bases (pb), del sitio de reconocimiento de las enzimas de restricción XbaI y BamHI.

Se realizó una digestión doble (simultánea), con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xba*I de los plásmidos p7Bam y pDA11 en presencia de un tampón compatible. El resultado fue, en ambos vectores, dos fragmentos de DNA:

- p7Bam: 128 bp (fragmento de interés, “polylinker”) + 5418 bp (resto del pDNA).
- pDA11: 143 bp (“polylinker”) + 3795 bp (fragmento de interés, pDNA).

Posteriormente, se aislaron y purificaron los fragmentos de DNA de interés, siguiendo el procedimiento descrito en el punto **4.2.5**

Empleando la enzima T4 DNA ligasa, se llevó a cabo la reacción de ligación de los fragmentos de DNA de interés: el “polylinker” (128 bp) y el plásmido pDA11 abierto (3795 bp). No es necesario un paso previo de defosforilación del plásmido abierto pDA11, porque los extremos no son cohesivos, y no hay posibilidad de recircularización del vector. El “polylinker” de p7Bam y el plásmido pDA11 abierto fueron añadidos en una proporción molar 3:1, respectivamente.

El plásmido resultante de la ligación fue un híbrido “polylinker de pET7 - plásmido pDA11”, de 3923 bp (128 bp + 3795bp), y se denominó pDp7. Los plásmidos recién formados se usaron para transformar en XL1-Blue Competent Cells. El análisis de los clones transformantes mediante digestión diagnóstica del DNA plasmídico con las enzimas *Dpn*I y *Nde*I, permitió reconocer los clones positivos que contienen el híbrido (Figura 18). La digestión con *Dpn*I debe producir un patrón de bandas similar al que resultaría en pDA11; mientras que la digestión con *Nde*I produce la linealización del plásmido (observándose una banda a 3923 bp), puesto que el “polylinker” de pET7 presenta un sitio de corte *Nde*I (siendo inexistente esa secuencia en pDA11).

Clones 1, 2, 3 y 4: el vector digerido con *Dpn*I y *Nde*I se ajusta al patrón esperado. Los vectores fueron controlados mediante secuenciación del polylinker, comprobando que el plásmido purificado a partir del clon 1 tenía la secuencia mutada. Este plásmido se eligió para realizar el último paso.

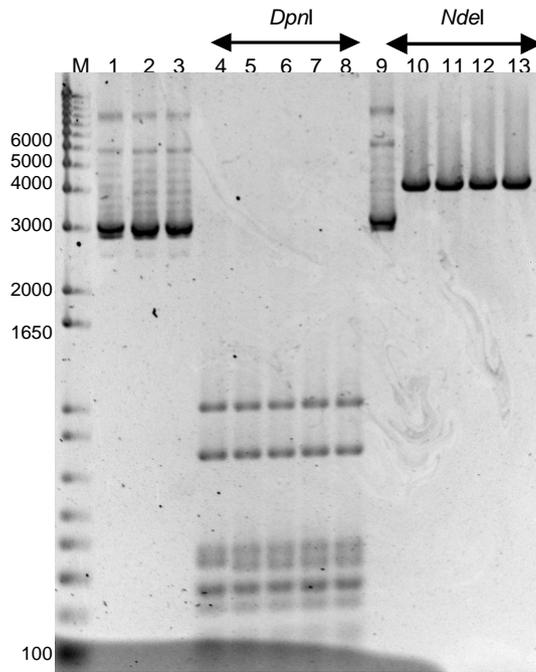


Figura 18. Foto de electroforesis de pDNA en gel de agarosa al 1%. M = marcador 1kb Plus, 1 = plásmido pDAII, 2 = clon 1, 3 = clon 2; **DpnI:** 4 = pDAII digerido, 5 = clon 1, 6 = clon 2, 7 = clon 3, 8 = clon 4; **NdeI:** 9 = pDAII, 10 = clon 1, 11 = clon 2, 12 = clon 3, 13 = clon 4.

5.2.3. Mutagénesis sitio-dirigida sobre el “polylinker” del vector de clonación pDp7. Generación del sitio *Bam*HI 5’.

En la Figura 19 se muestra la posición relativa donde se originó segunda secuencia de corte *Bam*HI sobre el vector pDp7 (plásmido de clonación pDAII con el polylinker del plásmido de expresión pET7)

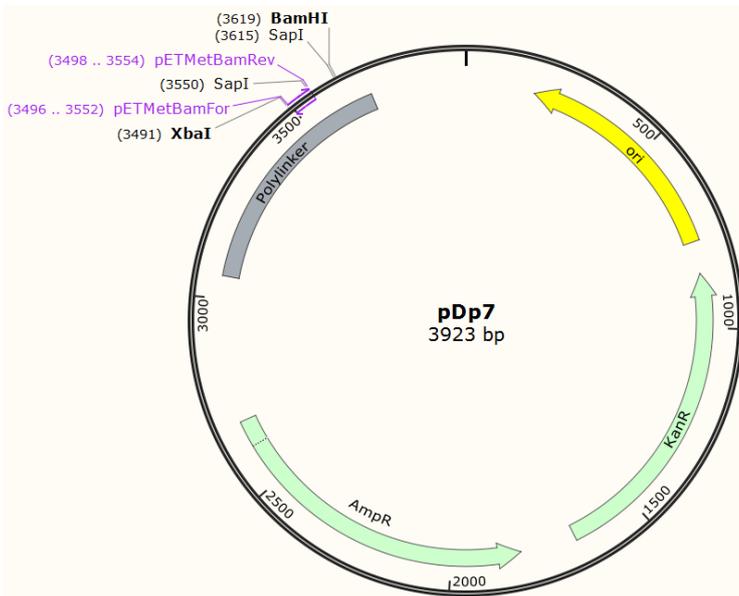


Figura 19. Representación de los principales dominios del plásmido pDp7, y la posición (en bp) de la hibridación de los cebadores (en morado) y de los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción *Bam*HI, *Xba*I y *Sap*I.

Previo a la amplificación, se llevó a cabo una nueva puesta a punto de la PCR.

Condiciones de la PCR:	Desnaturalización inicial	98°C: 5'	} 30 ciclos
	Desnaturalización	95°C: 45''	
	Hibridación	45°C: 30''	
	Elongación	70°C: 6'	
	Elongación final	70°C: 10'	
	Conservación	15°C	

Como se aprecia en la Figura 20, Panel A, calle 3, la amplificación con la pareja de cebadores (de secuencia complementaria) pETMetBamFor y pETMetBamRev y la polimerasa Phusion High-Fidelity determinaron la formación de una banda de tamaño correspondiente al plásmido lineal (3923 bp) que contendrá la mutación deseada.

Tras la digestión con *DpnI*, eliminando el DNA molde, se transforma en células competentes XL-1 Blue. El análisis de los clones transformantes mediante doble digestión diagnóstica del DNA plasmídico con las enzimas *SspI* y *BamHI* (Panel B) permite reconocer los clones positivos que contienen la mutación buscada, pues se producen, entre otras, dos bandas, de 274 bp y 98 bp, mientras que si no está presente la mutación (clones negativos), se origina una banda de 372 bp (274 bp + 98 bp).

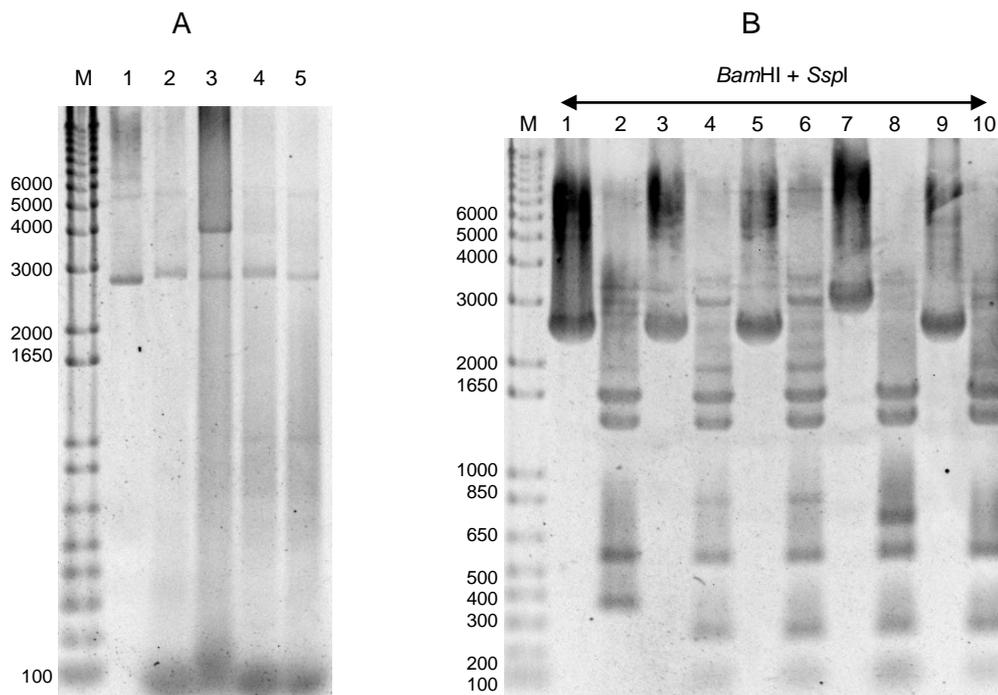


Figura 20. Foto de electroforesis de DNA en gel de agarosa al 1%.

Panel A: M = marcador 1kb Plus, 1 = plásmido pDp7, 2 = producto PCR polimerasa Phusion Hot Start II, 3 = producto PCR Phusion High-Fidelity, 4 = producto PCR Herculasa II Phusion, 5 = producto PCR polimerasa *PfuTurbo*.

Panel B: M = marcador 1kb Plus, 1 = plásmido pDA11, 2 = pDA11 doble digestión, 3 = clon 1, 4 = clon 1 doble digestión, 5 = clon 2, 6 = clon 2 doble digestión, 7 = clon 3, 8 = clon 3 doble digestión, 9 = clon 4, 10 = clon 4 doble digestión.

Clon 3: el vector digerido con *BamHI* y *SspI* genera una banda intensa de 750 bp que no se ajusta al patrón; también se observa que el pDNA sin digerir presenta una movilidad anómala respecto al resto de plásmidos. Clones 1, 2, y 4: el vector digerido con *BamHI* y *SspI* se ajusta al patrón esperado.

Los vectores de los clones 2 y 4 fueron controlados mediante secuenciación del polylinker, comprobando que el plásmido resultante poseía todos los elementos propios de la construcción (Figura 21). Este plásmido se denominó pDBam.

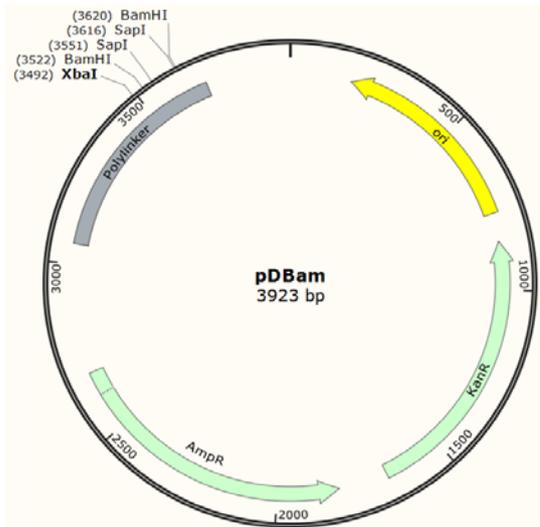


Figura 21. Representación de los principales dominios del nuevo plásmido pDBam, mostrando la posición (en bp) de los sitios de corte *Bam*HI, *Xba*I y *Sap*I.

5.3. Desarrollo de la construcción génica “pET7-TGFβ”

Uno de los principales usos de los ELR en Medicina, es su aplicación actuando como “scaffolds” o matrices de soporte.

En la construcción “pET7-TGFβ”, la secuencia TGFβ se corresponde con un péptido de 7 aminoácidos que simula el dominio de unión de TGF-β1 y podría tener actividad anti-inflamatoria (controlando la reactividad de las células T)¹⁵.

Al clonar un gen ELR en el vector con *Sap*I, se expresará un recombinámero ligado covalentemente a dicho péptido, pues ambas secuencias se encuentran adyacentes. De esta forma, los ELR formadores de matrices tendrán una nueva función, facilitando el proceso de recuperación o evitando un rechazo tras una operación.

5.3.1. Mutagénesis sitio-dirigida sobre el vector de expresión pET7. Sustitución nucleotídica.

En la Figura 22 se muestra la posición relativa donde se originó el cambio de nucleótidos. La mutación no altera la secuencia de corte *Sap*I.



Figura 22. Izquierda: representación de los principales dominios del plásmido pET7, y la posición (en bp) de la hibridación de los cebadores (en morado) y de los sitios de reconocimiento de la enzima de restricción *Sap*I. Derecha: posición donde se produce el cambio de nucleótidos (mutaciones en minúscula).

Condiciones de la amplificación análogas a la PCR del punto 5.2.3

Condiciones de la PCR:	Desnaturalización inicial	98°C: 5´	} 30 ciclos
	Desnaturalización	95°C: 45´´	
	Hibridación	45°C: 30´´	
	Elongación	70°C: 7´	
	Elongación final	70°C: 10´	
	Conservación	15°C	

Como se aprecia en la Figura 23, calle 3, la amplificación con la pareja de cebadores (de secuencia complementaria) TGF1For y TGF1Rev y la polimerasa Phusion High-Fidelity determinaron la formación de una banda de tamaño correspondiente al plásmido lineal (5546 bp) que contendrá la mutación deseada.

Se digiere el vector pET7 molde con *DpnI*, empleándose los plásmidos recién sintetizados para transformar en XL1-Blue Competent Cells.

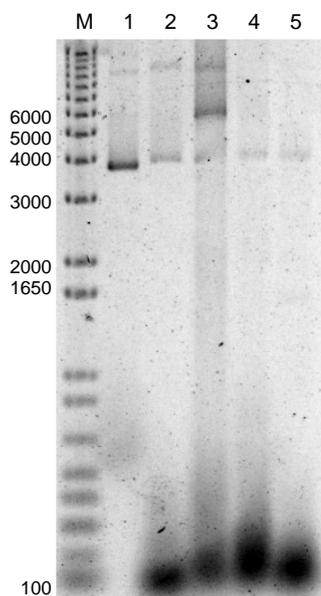


Figura 23. Foto de electroforesis de DNA en gel de agarosa al 1%. M = marcador 1kb Plus, 1 = plásmido pET7, 2 = producto PCR polimerasa Phusion Hot Start II, 3 = producto PCR Phusion High-Fidelity, 4 = producto PCR Herculasa II Phusion, 5 = producto PCR polimerasa *PfuTurbo*.

Los vectores fueron controlados mediante secuenciación del polylinker, comprobando que el plásmido purificado tenía la secuencia mutada. Este plásmido se denominó pET7-mutado.

5.3.2. Mutagénesis sitio-dirigida sobre el vector de expresión pET7-sustituido. Inserción nucleotídica.

En la Figura 24 se muestra la posición relativa donde se originó la inserción de nucleótidos. La secuencia de corte *SapI* sigue sin alterarse.

Mismas condiciones de amplificación que las impuestas a la PCR del punto anterior 5.3.1.

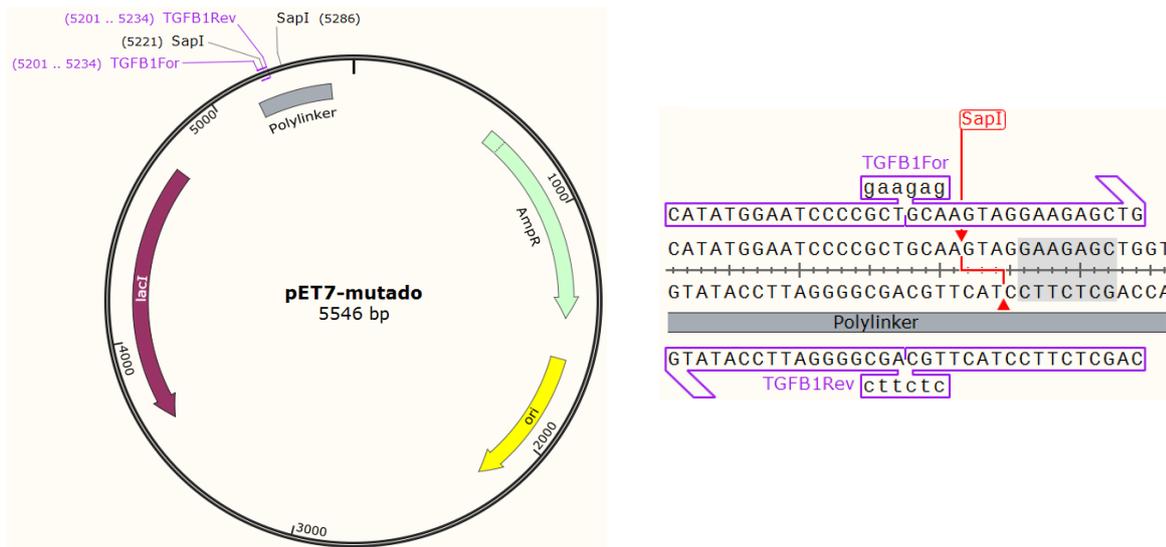


Figura 24. Izquierda: representación de los principales dominios del plásmido pET7-mutado, y la posición (en bp) de la hibridación de los cebadores (en morado) y de los sitios de reconocimiento de la enzima de restricción *SapI*. Derecha: posición donde se produce la inserción nucleotídica (mutación en minúscula).

Como se aprecia en la Figura 25, calle 2, 3 y 5, la amplificación con la pareja de cebadores (de secuencia complementaria) TGFB1For y TGFB1Rev y la polimerasa Phusion Hot Start II, Phusion High-Fidelity y *PfuTurbo* (respectivamente) determinaron la formación de unas bandas de tamaño correspondiente al plásmido lineal (5552 bp; 5546 bp + 6 bp de la inserción) que contenía la mutación deseada.

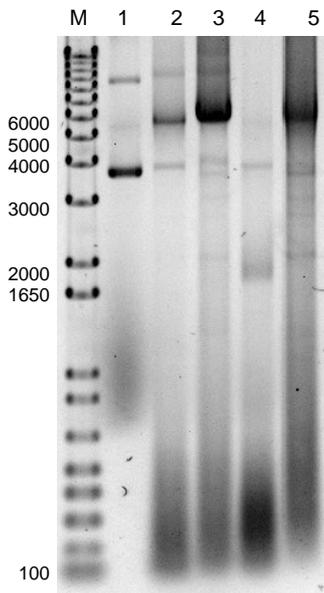


Figura 25. Foto de electroforesis de DNA en gel de agarosa al 1%. M = marcador 1kb Plus, 1 = plásmido pET7, 2 = producto de la PCR con la polimerasa Phusion Hot Start II, 3 = producto de la PCR con Phusion High-Fidelity, 4 = producto de la PCR con Herculasa II Phusion, 5 = producto de la PCR con la polimerasa *PfuTurbo*.

Se eligió el producto de la PCR con Phusion Hot Start II (digerido con *DpnI*) para transformar en células competentes (pues se trata de la amplificación más limpia) para. Los vectores fueron controlados mediante secuenciación del polylinker, comprobando que el plásmido purificado tenía la secuencia mutada. Este plásmido se denominó pET7-TGFB (Figura 26).

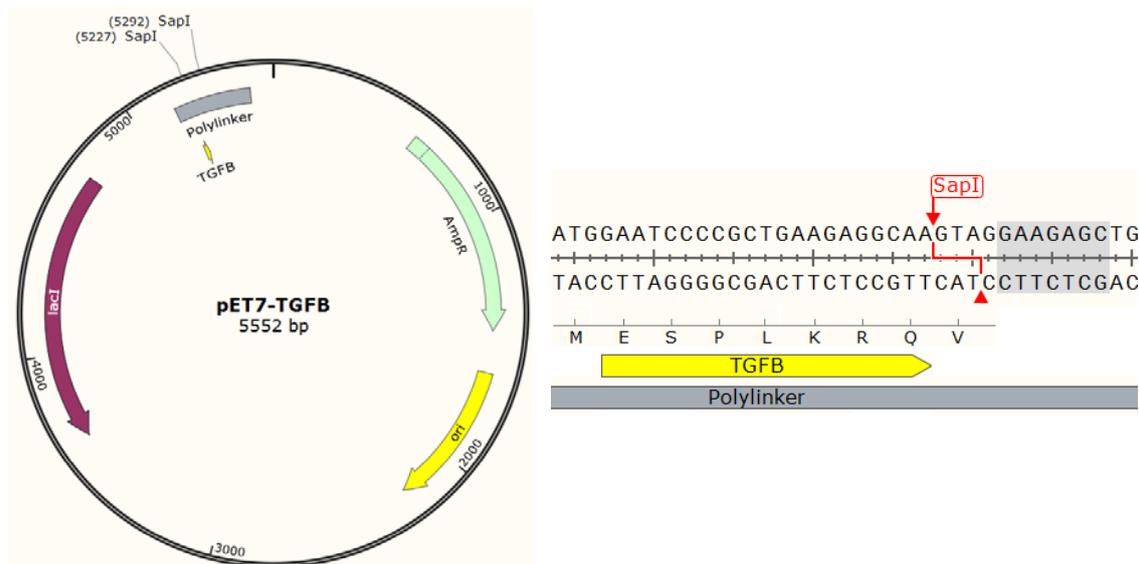


Figura 26. Representación de los principales dominios del plásmido pET7-TGFB, y la posición (en bp) de los sitios de reconocimiento de la enzima de restricción SspI.

6.- CONCLUSIONES

-Se ha llevado a cabo la construcción de una nueva plataforma plasmídica “**pDBam**”. Este nuevo plásmido generado a partir de dos vectores previos, permitirá el transporte de un determinado gen al plásmido lentiviral “pLV” para su posterior aplicación en la transfección de células eucariotas.

-Se ha desarrollado una nueva construcción denominada “**pLV-LOX**”. Este vector, permitirá la transfección estable de células eucariotas y la sobreexpresión de la enzima Lisil oxidasa por las mismas. Esto posibilita generar un entrecruzamiento *in situ* de una disolución de ELRs con lisinas, al embeberla junto a células transfectadas, originando un gel lo más biocompatible y biomimético posible. Entre el gen LOX y el gen reporter eGFP, existe una secuencia T2A, de forma que durante la traducción se liberará eGFP, permitiendo, además, seguir la actividad de las células *in vivo*.

-Se ha generado una nueva construcción plasmídica, llamada “**pET7-TGFβ**”. Al insertar un gen ELR junto a la secuencia TGFβ, se expresarán ambos como una única entidad, obteniendo así ELRs con actividad anti-inflamatoria, y susceptible de usarse para inducir diferenciación mediada por TGFβ de células mesenquimales con partículas/hidrogeles basados en ELRs que contengan esa secuencia.

7.- BIBLIOGRAFÍA

-
- ¹Gómez M.J.; La Revolución de la Ingeniería Genética; *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, **2013**, 20.
- ²Higgins, S.J., Hames, B.D.; Protein expression a practical approach; **1999**, Oxford express.
- ³Nabih A.B., Mohammed N.B., Abdullah S., Roop S.B., Cell factories for insulin production *Microb Cell Fact.*, **2014**, 13.
- ⁴Hall R.; Biotechnology for plant disease control: Application of biotechnology to plant pathology; *Com. J. Plant. Pathol*, **1987**, 9.
- ⁵Arias F.J., Santos M., Fernández-Colino A., Pinedo G., Girotti A.; Recent Contributions of Elastin-Like Recombinamers to Biomedicine and Nanotechnology; *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2014**, 14.
- ⁶Stephen T.K., Jocelyn E.K., Lewin, B., Goldstein, E.; *Lewin's genes X*; **2011**. Boston: Jones and Bartlett.
- ⁷Sandra A.H., Edgell M.H, Patricia G.S, Michael S.; Mutagenesis at a Specific Position in a DNA Secuence; *The Journal of Biological Chemistry*, **1978**, 18.
- ⁸Sambrook, J., Fritsch E.F., Maniatis T.; Molecular cloning, a laboratory manual; **1989**, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- ⁹Klein D.W., Prescott L.M., Harley J.P; *Microbiology*, **1999**, Boston: WCB/McGraw-Hill.
- ¹⁰Girotti A.; “Desarrollo de una plataforma biotecnológica para la obtención de polímeros recombinantes tipo elastina” PhD Thesis, **2007**.
- ¹¹Ribeiro A.; Functionality development in systems based on Elastin-like recombinamers: From nano-objects to macrogels. PhD Thesis, **2008**.
- ¹²de Torre I.G., Santos M., Quintanilla L., Testera A., Alonso M., Rodríguez-Cabello J.C.; Elastin-like recombinamer catalyst-free click gels: Characterization of poroelastic and intrinsic viscoelastic properties; *Acta Biomater*, **2014**.
- ¹³Kagan H.M., Trackman P.C.; Properties and function of lysyl oxidase; *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **1991**, 5.
- ¹⁴Rodríguez-Cabello J.C., Girotti A., Ribeiro A., Arias F.J.; Synthesis of Genetically Engineered Protein Polymers (Recombinamers) as an Example of Advanced Self-Assembled Smart Materials, *Methods in Molecular Biology*, **2012**, 811.
- ¹⁵Vaz E.R., Fujimura P.T., Araujo G.R., Silva R.L., Cunha T.M.; A Short Peptide That Mimics the Binding Domain of TGF- β 1 Presents Potent Anti-Inflammatory Activity; *PLoS ONE*, **2015**, 10.