

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

Facultad de Medicina

Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM)

Máster en Investigación Biomédica



DISEÑO Y SÍNTESIS DE UN NUEVO BIOMATERIAL RECOMBINANTE PARA USO EN REGENERACIÓN TISULAR NEURONAL

Trabajo Fin de Máster presentado por:

Yu Zou

Tutor:

Dra. Alessandra Girotti

Dr. F. Javier Arias Vallejo

Valladolid 2016/17

INDICE

1.- RESUMEN.....	1
2.- INTRODUCCIÓN.....	2
3.- OBJETIVOS.....	6
4.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
6.- CONCLUSIONES.....	20
7.- BIBLIOGRAFÍA.....	21

ABREVIATURAS

C3bot: C3 transferasas de ribosilación de ADP

bp: pares de bases

ELR: recombinámero de tipo elastina

ECM: extracellular matrix

SL: silk-like

h: horas

min: minutos

kbp: kilopares de bases

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

rpm: rotación por minuto

kDa: kilodalton

Tt: temperatura de transición

1.- RESUMEN

Los materiales proteicos naturales tienen propiedades incomparables debido a la selectividad estricta de la naturaleza. De modo que la ciencia de materiales nuevos se fija cada vez más en la modificación de los conocidos. En este estudio diseñamos y sintetizamos las proteínas que tenían la estructura de proteína de elastina y el efecto de regeneración neuronal. Se llevó a cabo mediante las técnicas de ingeniería genética. Seleccionamos *Escherichia coli* como el portador que llevaba plásmidos específicos para la subclonación de DNA y la expresión de nuestros materiales. Construimos el gen cortando y ligando los fragmentos plasmídicos y lo subclonamos en las bacterias. Analizamos los productos obtenidos y los purificamos. La identificación de las proteínas no solo se trata de medir el peso molecular o deducir la estructura, sino de confirmar si tienen las funciones concebidas. Todavía hace falta el estudio de farmacología y ciencia de materiales.

1.- ABSTRACT

Natural protein materials have terrific properties due to the strict selectivity of the nature. So now the new materials science focus more and more on the modification of the proteins that we already knew well. In this research we designed and synthesized the proteins that had the structure of elastin and the neuron-regeneration effect. It was all realized by the genetic engineering technics. We choosed *Escherichia coli* as the carrier to bring the specific plasmids for the DNA subcloning and the expression of our materials. We had constructed the gene by cutting and connecting the plasmidic fragments and we subcloned them in the bacterium. We analyzed the resulting products and purified them. The identification of the proteins is not only the measuring of its molecular mass o deduction of the structure, but also figuring out if they have the conceived function. And this research still need the next pharmacologic and materials science study.

2.- INTRODUCCIÓN

2.1. Biomateriales de tipo elastina

La estrategia reciente de la ciencia de materiales tiende a imitar los diseños que existen en la naturaleza, ya que las propiedades que exhiben fueron logradas durante millones de años. En ingeniería tisular, es un gran desafío crear un esqueleto biomimético que funcione como la matriz extracelular (ECM) natural debido a su alta complejidad. La matriz artificial tiene que reproducir la interacción entre ella y las células, incluye adhesión celular, sensibilidad a las proteasas etc.

Estudios previos demostraron que los polímeros de tipo elastina eran capaces de cumplir estas condiciones. Elastina es un componente muy importante en la matriz extracelular. ELRs (recombinámeros de tipo elastina) demuestran la transición reversible de fase una vez llegue a una temperatura específica, conocida como T_t (temperatura de transición). El polímero se queda soluble cuando está en un medio acuoso y debajo de la T_t . Además tienen muchas ventajas interesantes tales como su fórmula inyectable, la autoorganización después de la implantación y la propiedad mecánica estable etc. Lo más importante, son totalmente biocompatibles. ^[1] En las elastinas naturales, normalmente existe la secuencia que proporciona la adhesión celular que facilita la estabilidad de la red de gel.

Se sabe también que los motivos de tipo seda (SL) adoptaban espontáneamente una estructura lámina β que se caracteriza por la estabilidad. Junto con su propiedad biocompatible, han propulsado el desarrollo de gran variedad de materiales inspirados en la fibroína de la seda. Por otra parte, el alto contenido del bloque SL puede hacer que el proceso de autoensamblado de elastina sea muy lento, incluso imperceptible. ^[2] De modo que el contenido SL debería estar en un alcance apropiado para preparar un material de ELRs.

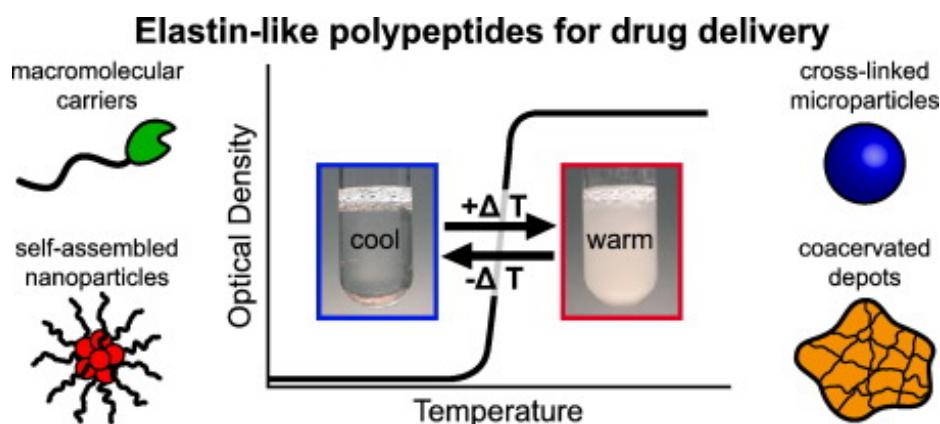


Fig.1 ELRs en administración de fármacos

2.2. Regeneración neuronal (C3bot)

Clostridium botulinum puede producir el prototipo de C3 transferasas que ribosilan ADP (C3bot). Se dirige a las proteínas de la familia Rho de GTPasas: RhoA, B y C inactivándolas. Así que C3 transferasas afectan a las funciones celulares dependientes de Rho.

En el estudio neurocientífico previo, se mostró que C3bot transferasas podía promover el crecimiento axonal en cultivo neuronal primaria, modelo de lesión del nervio óptico y daño de médula espinal experimental. No actúan solo como una enzima, sino también son capaces de promover la extensión de neurita. En la aplicación de C3bot deficiente de enzima, cuyo aminoácido catalítico había sido

eliminado, tenía el efecto de facilitar el crecimiento de neuronas de hipocampo. El estudio posterior determinó la longitud mínima del fragmento de aminoácidos (29aa) que todavía son capaces de inducir la ramificación en cultivo primario neuronal y el crecimiento axonal y dendrítico ^[3]. Todo esto demuestra que C3bot transferasas tiene un enorme potencial en la aplicación biológica in vivo.

2.3. Ingeniería genética

La síntesis de proteínas ha sido estudiada muchos años pero todavía es un desafío global. Los científicos se dieron cuenta de que era un trabajo extremadamente complejo generar las proteínas de alta complejidad mediante la manera química tradicional. Y la ingeniería genética nació bajo esta situación. Pronto se descubrieron las ventajas y empezó la revolución de biología. Desde la insulina, miles de proteínas más complejas fueron producidas de manera biosintética.

2.3.1 Clonación de DNA

La estructura y las propiedades de proteínas naturales dependen de el gen que las codifique. Se denomina transformación el proceso mediante el que las células ingieren los materiales genéticos exógenos. Mientras que las células se dividen, replican su propio gen y el exógeno que han obtenido. Si insertamos un fragmento de DNA foráneo (de otro organismo) en este vector, y transformamos el gen recombinante en las células hospedadoras, también replica la parte foráneo.

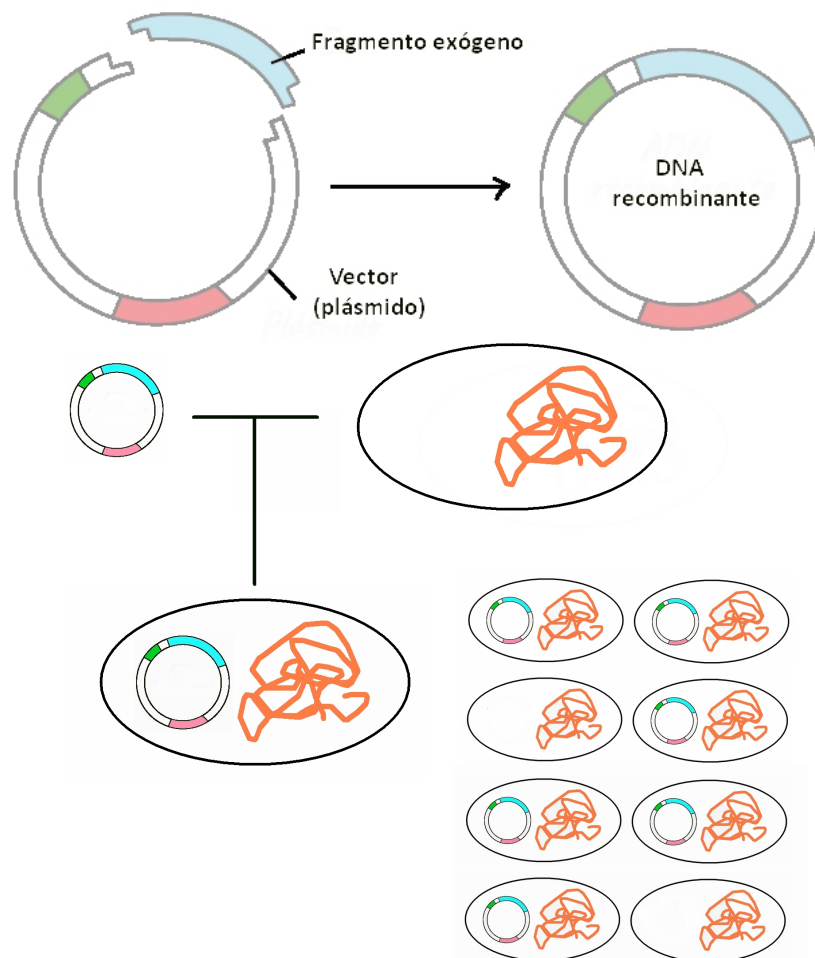


Fig.2 Plásmido recombinante y la transformación

Las células hospedadoras más utilizadas para la transformación y la expresión proteica son bacterias sin duda alguna. Tienen ventajas incomparables: la estructura sencilla, el genoma de poca cantidad, fácil de cultivar, alta eficiencia de incorporación del gen exógeno y proliferación rápida, etc.

Los vectores más usados son plásmidos. Normalmente son pequeños DNAs circular de doble cadena. Se caracterizan por la capacidad de replicarse de manera independiente del DNA genómico. Generalmente, los plásmidos no son imprescindibles para las bacterias. Es posible que abandonen los plásmidos cuando se dividen. Pero en algunos plásmidos se encuentra el gen que puede ser útil, por ejemplo el que les confiera la resistencia adicional a antibióticos.

Cada plásmido contiene por lo menos una secuencia de DNA que sirve para iniciar la replicación. Se denomina origen de replicación. Y este punto de partida permite al plásmido duplicarse de manera independiente del DNA genómico. Además, la región artificial dentro de las secuencias de los genes que codifican para la inserción de los genes, que posee múltiples sitios de restricción, se nombra *polylinker* (sitio de multiclonación) ^[4]. Estos vectores que sirven para la recombinación de DNA son normalmente de tamaño pequeño (menos de 250Kb), que facilita la entrada a las células.

Entre miles de DNA de este tipo, cuando seleccionamos los plásmidos de expresión, lo que importa es la integridad de sus promotores y reguladores que son imprescindibles para la transcripción. Al contrario, para los de clonación, es mejor que carezcan de los mencionados anteriormente. En dicho caso, cuando se duplican las células, la concentración de DNA es relativamente más alta gracias a menor cantidad de productos de expresión. Y suelen encontrarse varias copias de plásmidos de clonación en una célula, eso también facilita la extracción y purificación de DNA.

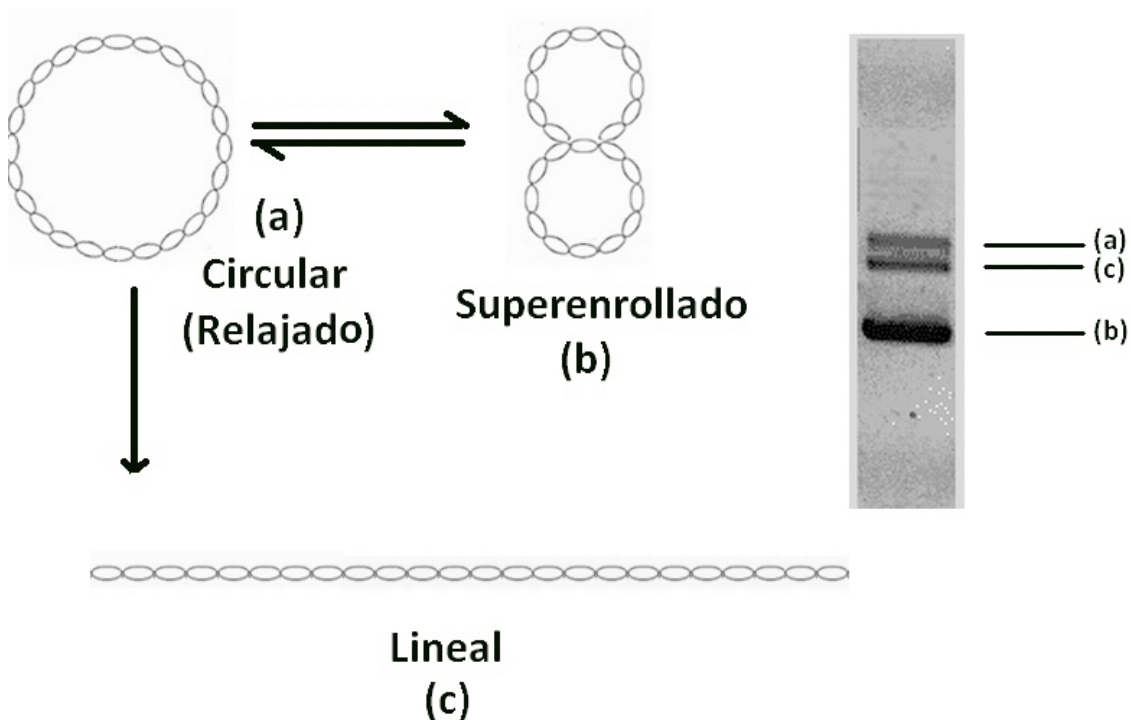


Fig.3

Izquierda: Diferentes conformaciones de plásmidos.

Derecha: la electroforesis de 3 conformaciones de un tipo de plásmido.

(a) Plásmido circular o relajado; (b) Superenrollado; (c) Lineal.

La forma de los plásmidos afecta a su velocidad de migración o avance en el gel de electroforesis. Generalmente aparecen en 3 conformaciones, son:

- Circular o relajada: las hebras de DNA no cortadas, pero desenrollado.

- Lineal: las hebras de DNA contienen 2 extremos libres. Normalmente es porque fueron cortadas pero raras veces existen de esta forma en el organismo.

- Superenrollada: las hebras de DNA no cortadas y una estructura muy compacta. Fue formada por girasa, una topoisomerasa de tipo II. Si bien el proceso de formación gasta energía, es rentable. La energía potencial podrá ser utilizada luego.

La diferencia entre conformaciones se puede caracterizar por la movilidad en el gel electroforético de DNA. Las moléculas superenrolladas avanzan más rápidas que las circulares y las lineales gracias a su menor volumen. Es decir, se mueven con más facilidad a través de los poros del gel. Habitualmente los plásmidos lineales mueven un poco más rápido que los circulares pero depende de cada tipo de plásmido y la condición del gel electroforético.

2.3.2 La expresión del producto proteico

Los plásmidos de expresión normalmente presentan una baja cantidad de copias en células pero tienen alta capacidad de inducir la transcripción en las condiciones adecuadas. Las células también expresan sus propias proteínas, que son imprescindibles para sí mismo. Aunque el plásmido que transformamos es exógeno, los productos de expresión no serán secretados al carecer de un péptido líder. Todavía hace falta el proceso de separación y purificación. Para la rotura de células hay muchas maneras, lo que importa es mantener la integridad de la estructura proteica. El reto es obtener un buen rendimiento protegiendo la actividad. Si las propiedades de un producto tienen muchas diferencias respecto a las impurezas, será más posible ser separado completamente. A veces se saben completamente las propiedades de un material nuevo, puede encontrarse entre cualquier fase de las etapas durante la separación. Por esta razón, necesitamos llevar a cabo un análisis rápido para confirmar en cuál está.

La manera más clásica del análisis proteico es la electroforesis. La SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) es una técnica ampliamente usada en biología molecular, bioquímica e inmunología etc. Distingue las proteínas según la movilidad electroforética que depende de la masa molecular.

El punto isoelectrico proteico depende de los grupos funcionales de la molécula. Cada aminoácido tiene su punto isoelectrico específico. Así que podemos obtener el valor aproximado calculando. Este valor ayuda la separación aunque no es el valor exacto. La solubilidad de una proteína baja cuando el pH de la solución se acerca a su punto isoelectrico.

Aunque estructuralmente el producto proteico es un conjunto de las cadenas peptídicas, es un material nuevo y puede tener las propiedades diferentes a aquellas proteínas. Y estas propiedades especiales también facilitan la separación y la purificación.

3.- OBJETIVOS

Este trabajo se centra en el diseño y la síntesis de un nuevo material proteico de tipo elastina que tiene efecto en la regeneración neuronal. La síntesis se lleva a cabo de manera biológica en la bacteria *Escherichia coli*. Los bloques génicos que se utilizan para codificar las proteínas son Pentasilk, CM2, C3bot. Entre ellos, CM2 funciona como dominio de hidrólisis para que se elimine el fragmento C3bot. Así que C3bot siempre se encuentra en el extremo de la cadena proteica, al lado del fragmento CM2.

Entre las proteínas concebidas, diseñamos 3 esquemas:

Estrategia A: C3bot está en el extremo amino.

Estrategia B: C3bot se encuentra en el extremo carbonilo.

Estrategia C: C3bot ocupan ambos extremos de la cadena proteica.

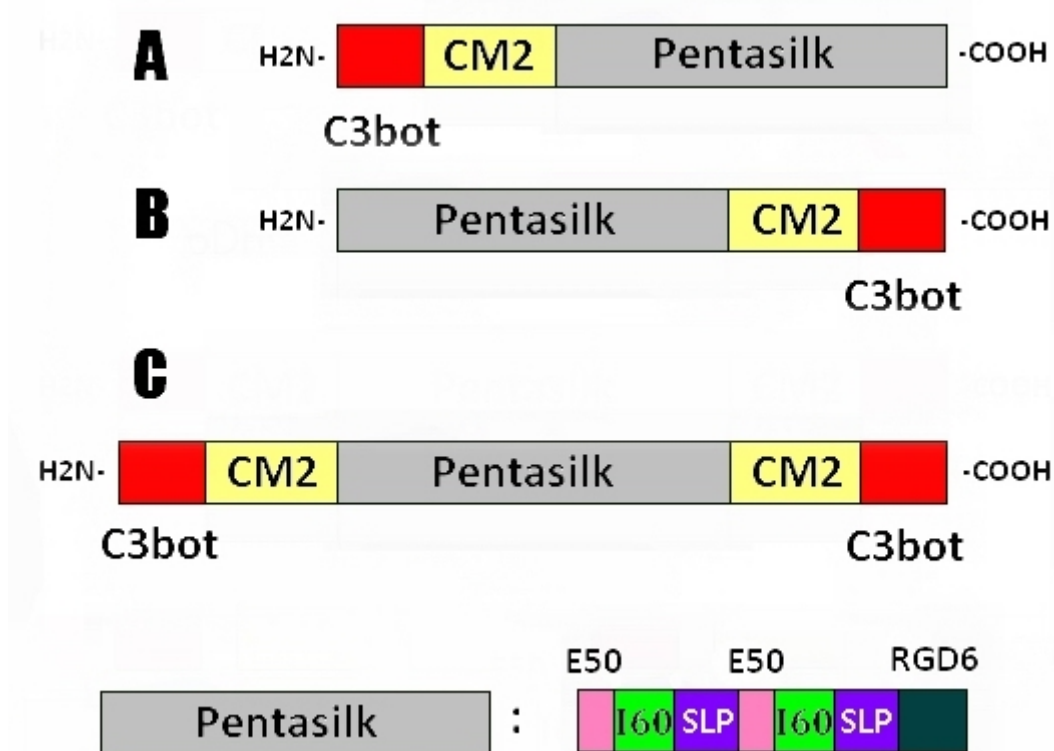


Fig.4 Estrategias de la estructura proteica

Todos los genes son del Banco de Plásmidos del grupo BIOFORGE. Se encuentran en la zona polylinker del vector plasmídico de clonación pDrive ALL independientemente. Se concatenan los fragmentos utilizando las enzimas de restricción y de ligación. Después se insertan en la zona polylinker del vector plasmídico de expresión. Al siguiente se transforman los plásmidos de expresión en la cepa bacteriana BLR para la expresión. Al final se separan y se purifican las proteínas del medio de cultivo.

El trabajo no se trata de un estudio farmacológico ni histológico. Se fija en el diseño y la construcción de los genes que codifiquen los materiales de tipo elastina. Después también se realizan la expresión y la purificación proteica. El objetivo es la construcción de DNA recombinante y la generación de materiales proteicos recombinantes mediante la ingeniería genética.

4.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

4.1.1. Materiales de biología molecular

4.1.1.1. Enzimas de restricción

Eam I (*Eam 1104*), *Sap I* (*Lgu I*), *Xba I*, *FastDigest Eam I* (*Eam 1104*), *FastDigest EcoR I* (Thermo Fisher).

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

Las enzimas de tipo *FastDigest* sirve para la diagnosis de gen.

4.1.1.2. Otras enzimas

T4 DNA Ligase, FastAP Phosphatase, Shrimp alkaline phosphatase (SAP).

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 subclonación.

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

Nota: XL-1 Blue Competent Grade y XL-1 Blue Subcloning Grade son deficiencia enzimática de restricción.

-BL21 (DE3) pLysE chemically competent cells. (Lucigen® E.cloni®Express)

-BLR competent cells obtenidos del grupo BIOFORGE.

4.1.1.4. Medios de cultivo

Medios empleados en el crecimiento bacteriano:

-**Luria-Bertani (LB):** 25 g/L (Pronadisa). Se esteriliza en autoclave (120 °C, 20 min). Suplementado con antibióticos correspondientes o glucosa a la concentración de uso.

-**LB-agar (placas de cultivo):** medio LB (25 g/L) con un 1,5% (p/v) agar (Fluka). Se esteriliza en autoclave (120 °C, 20min). Suplementado con antibióticos correspondientes a la concentración de uso.

Medio empleado en las transformaciones bacterianas:

-**SOC Broth (Sigma Aldrich).**

Medio empleado en la expresión:

-**Terrific Broth (TB):** 47 g/L (glicerol 4 mL/L). Se esteriliza en autoclave (120 °C, 20 min). Suplementado con antibióticos correspondientes a la concentración de uso.

Antibióticos utilizados, a concentración de stock (1000X):

-**ampicilina** (100 mg/mL), **kanamicina** (30 mg/mL), **cloranfenicol** (en etanol, 34 mg/mL), tetraciclina (en etanol, 12,5 mg/mL)

4.1.1.5. Vectores plasmídicos

Las plataformas vectoriales utilizadas en este trabajo han sido:

-Vector de expresión: pET7 Rare, construido previamente en este mismo laboratorio a partir del vector pET-25b (+) de Novagen, por la Dra. A. Girotti^[5] y Tatiana Flora.

-Vector de clonación: pDriveAll, modificado por este grupo a partir del vector pDrive de Qiagen, por el Dr. A. Ribeiro^[6].

4.1.1.6. Genes sintéticos

Fragmento **Pentasilk**, codifica la secuencia proteica:

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

Cuenta con 7 subdominios: E-I-S-E-I-S-RGD₆

(E: [(VPGVG)₂VPGE(VPGVG)₂]₁₀ I: (VGIPG)₆₀ S: [V(GAGAGS)₅G]₂

RGD₆: [(VPGIG)₅AVTGRGDSPASS]₆)

Fragmento **CM2**, codifica la secuencia proteica:

VGGGGGPMGPSGPWGGGGGVGGGGQPQGLAKGGGGVGGGGPQGIWGQGGGG

Fragmento **C3bot**, codifica la secuencia proteica:

VAKGSKAGYIDPISAFAGQLEMLLPRHST

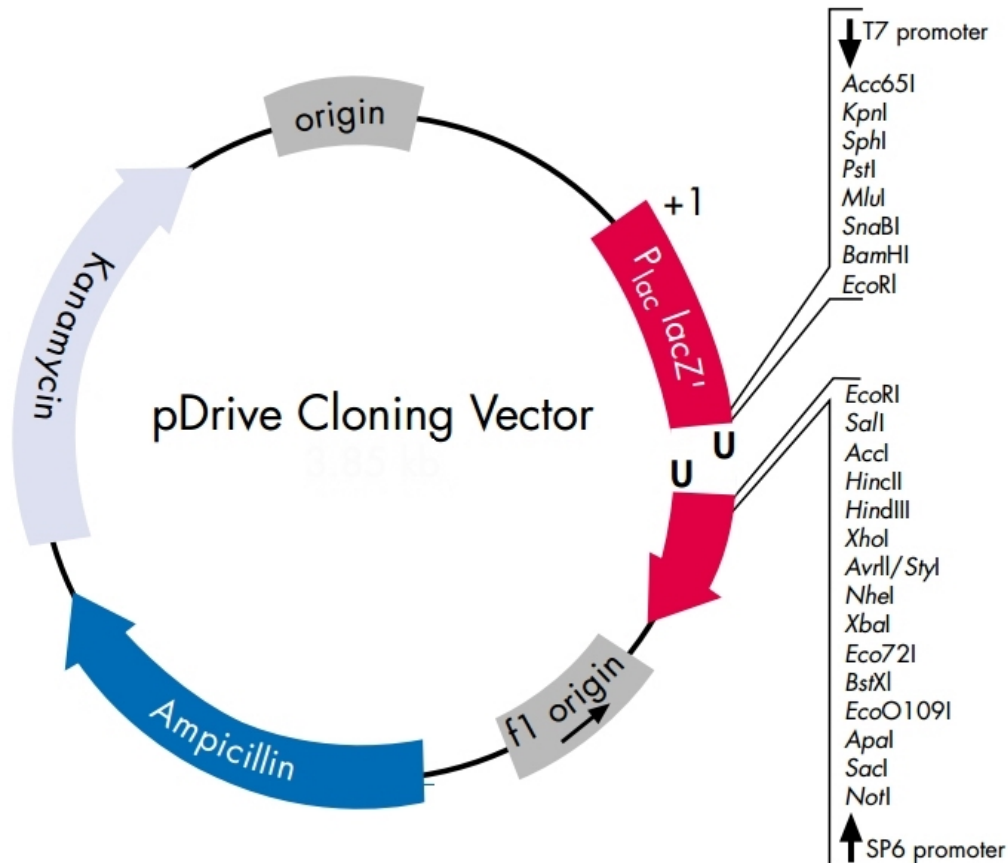


Fig.5 Mapa del plásmido p Drive

odos los genes fueron sacado del Banco de plásmido, y se encontraban independientemente en la zona de inserción (polylinker) del plásmido pDrive ALL. Es decir, al principio ya hay 3 tipos de plásmidos pDrive ALL, se denominan pDA Penta, pDA CM2, pDA C3bot, que contiene el fragmento Pentasilk, CM2 y C3bot respectivamente.

4.1.1.7. 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).

4.1.1.8. Inhibidores de proteasas

Los inhibidores de proteasas se añaden en el proceso de purificación de productos proteicos por si se produce la hidrólisis de proteínas.

Los utilizados son (a concentración 100X menos PMSF): PMSF (1000X), AEBSF, leupeptina, E-64, Pestatina A, EDTA

4.2. Métodos

4.2.1. Electroforesis de DNA en gel de agarosa

La electroforesis en gel de DNA es una técnica que sirve para separar, analizar y purificar los fragmentos de DNA respecto a sus tamaños. El DNA puede ser el plásmido entero, fragmentos, o bien los productos de amplificación de PCR. El material del gel puede ser poliacrilamida o agarosa. No obstante, se utiliza poliacrilamida solo para separar los oligonucleótidos de tamaño pequeño. Elegimos agarosa como el material del gel, que es inocuo, de alta resolución y conveniente de preparar. Si bien el gel de agarosa generalmente sirve para separar los ácidos nucleicos de moléculas grandes (SeaKem® LE Agarose), también hay el modelo que puede separar los pequeños fragmentos de DNA (MetaPhor® Agarose).

Tamaño del fragmento (bp)	Concentración final de SeaKem® LE Agarose (%)	Concentración final de MetaPhor® Agarose (%)
800-10000	0,80	-
400-8000	1,00	-
300-7000	1,20	-
200-4000	1,50	-
100-3000	2,00	-
150-800	-	2,00
100-600	-	3,00
50-250	-	4,00
20-130	-	5,00

Tabla 1. Resolución para DNA asociado a diferentes concentraciones del gel de agarosa(SeaKem® LE Agarose y MetaPhor® Agarose) (en 1X TAE Buffer).

Las muestras incoloras se cargan añadiendo buffer de carga 5X hasta alcanzar una concentración final 1X. La electroforesis se lleva a cabo con un voltaje fijo, según es 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 unos 20 minutos en una solución 1X Simply Safe™ (EURX) en TAE 1X. Las bandas de DNA se visualizan en un transiluminador de luz UV Gel Doc™ EZ Imager. Como patrón de tamaño se emplea el marcador DNA 1kb Plus Ladder (Invitrogen).

4.2.2. Purificación de plásmidos

Los vectores utilizados en este trabajo fueron purificados usando sistemas NucleoSpin Plasmid (para muestras de poca cantidad) y Quantum Prep Plasmid Midiprep Kit (para muestras de alta cantidad), siguiendo el protocolo establecido por las casas comerciales. El DNA eluido es cuantificado y evaluada su pureza mediante Nanodrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific). Si a continuación no es empleado, se almacena a 4°C.

4.2.3. Digestión del DNA con enzimas de restricción

Las reacciones de restricción se realizan bajo las condiciones indicadas por las casas comerciales que suministran las enzimas (temperatura, concentración, buffer, tiempo de reacción, condiciones en las dobles digestiones, etc.). El alcance de la digestión se controla mediante electroforesis de DNA en un gel analítico.

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, concentración, buffer, tiempo de reacción, inactivación, etc.). Es necesario inactivar posteriormente las enzimas.

En la defosforilación de ambos plásmidos pDrive ALL y pET7 Rare, hay 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 Simply Safe™ (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 (4.1.1.7) *PureLink Quick Gel Extraction Kit* (Life Technologies). El DNA eluido es cuantificado y evaluada su pureza mediante Nanodrop 2000c Spectrophotometer de Thermo Scientific.

4.2.6. Reacción de ligación

Las ligaciones se realizan en un volumen total de 20 µL, mezclando el inserto y el vector en una proporción molar desde 5:1 hasta 10:1, y añadiendo T4 DNA ligasa, suplementada con el buffer correspondiente, atendiendo a las especificaciones propias del protocolo. La reacción se mantiene a 22°C durante 10 minutos, o hasta una hora para la mejor eficacia. Se puede utilizar el mixto de ligación para la transformación directa sin inactivación de la enzima.

4.2.7. Esquema de digestión y ligación en el plásmido p Drive ALL

Entre una gran cantidad de sitios de restricción, los más importantes son:
Ear I, Sap I.

Ear I



Sap I



Fig.6 Secuencias de reconocimiento (Ear I y Sap I)

Los sitios de corte de las dos enzimas están fuera de la secuencia de reconocimiento, hace que la cantidad de los sitios de restricción siempre mantenga constante añadiendo fragmentos de DNA. Así siempre se digiere “la izquierda” del gen de recombinación cuyo aminoácido codificado está en el extremo amino de la cadena proteica (Fig.7) ^[4]. La diferencia de la secuencia de reconocimiento solo es una base. Entonces el sitio de Sap I es un sitio de Ear I especial, y puede ser digerido por la enzima Ear I.

En el plásmido p Drive ALL hay 5 sitios de Ear I y solo un también es de Sap I. En un plásmido circular, la cantidad de fragmentos formados por enzimas de restricción es igual a la cantidad de sitios de restricción (como cortar una cuerda).

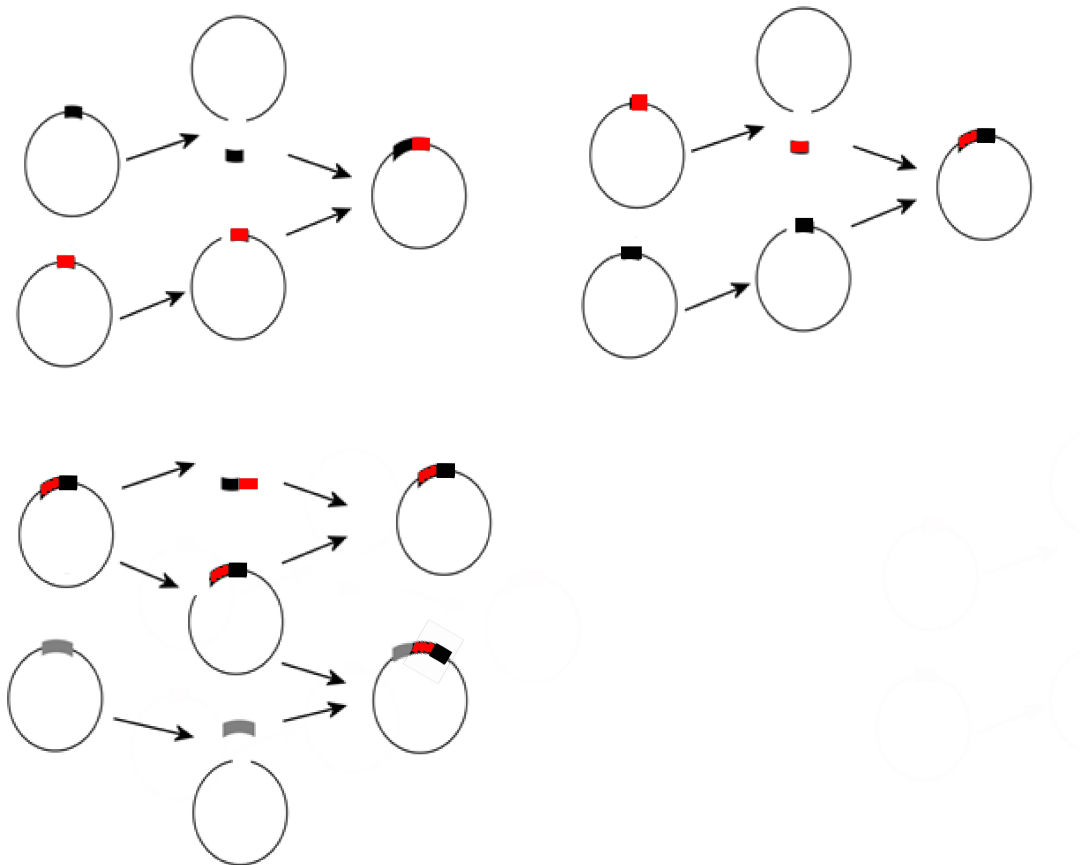


Fig.7 Esquema de concatenación de fragmentos

4.2.8. Transformación de las cepas bacterianas

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 - 24h). Una vez crecidas las colonias aisladas, son seleccionadas y picadas en campana de flujo laminar, llevándose a un falcon con medio LB/TB, suplementado con el antibiótico correspondiente o glucosa. Estos fálcones se incuban a 37°C, con agitación orbital (250rpm), hasta la observación de turbidez, indicando el crecimiento bacteriano (16h). Las placas donde hayan crecido colonias aisladas se guardan a 4 °C

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.

4.2.10. Análisis de proteínas

El tamaño de los polímeros recombinantes se evalúa mediante SDS-PAGE, la forma clásica del análisis de proteínas. Como la electroforesis de DNA, las proteínas llevan cargas negativas por la acción del detergente SDS y migran en el campo eléctrico.

La velocidad de migración de proteínas es proporcional a la cantidad de cargas que llevan. Normalmente no hay diferencia de la carga efectiva entre proteínas. SDS es un surfactante que desnaturaliza totalmente las proteínas rompiendo su estructura secundaria, hace que las cargas negativas se distribuyan uniformemente en las cadenas proteicas. Así las proteínas del mismo tamaño lleva más o menos igual cantidad de cargas y migra a velocidad similar.

	Resolving gel (10%)	Stacking gel (5%)
Agua MQ	3 mL	2,3 mL
Tris buffer (1.5M, pH 8.8)	1,825 mL	-
Tris buffer (0.5M, pH 6.8)	-	0,94 mL
Acrylamide(40%)	1,875 mL	0,375 mL
10% SDS	75 µL	37,5 µL
Persulfate	75 µL	37,5 µL
TEMED	5 µL	4 µL

Tabla.2 Un modelo de fórmula de gel (SDS-PAGE)

La concentración del resolving gel varía según el tamaño de proteínas que va a analizar. Se utiliza el de baja concentración para las moléculas grandes ya que el tamaño de poros de la red de acrilamida es mayor. El gel de poliacrilamida se puede teñir con Coomassie Brilliant blue o cloruro de cobre. Y el segundo método es 3 veces más sensible del Coomassie Brilliant blue.

5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Nota:

1. Para no repetirlos después, el plásmido p Drive ALL cuya zona de polylinker contiene gen se domina **PDA + nombre del gen**.

E.j. **PDA Pentasilk** significa el plásmido p Drive ALL cuyo sitio de multiclonación contiene el gen **Pentasilk**.

Si el plásmido está digerido, se añade el nombre de enzima detrás con paréntesis.

E.j. **PDA Pentasilk (Sap I)**

2. **Inserto + nombre del gen** significa el fragmento del gen que se obtiene digiriendo el plásmido “**PDA + nombre del gen**” con la enzima **Ear I**.

Tamaño de fragmentos de insertos:

C3bot: 90 bp CM2: 162 bp Pentasilk: 4173 bp Vector PDA (sin inserto):3,9 kbp

Tamaño de los fragmentos generados de pDrive all (digerir con Ear I):

250, 637, 1262, 1742 más el tamaño de inserto.

Vector pET7 Rare: 5 kbp

5.1. Construcción de plásmidos

5.1.1. Construcción del plásmido de estrategia A

PDA C3bot-CM2-Pentasilk

Hay dos esquemas:

1. Digerir PDA Pentasilk con Sap I (formación de vector), hacer la ligación con inserto CM2. Transformar y extraer plásmido PDA CM2-Pentasilk, digerirlo con Sap I, hacer la ligación con inserto C3bot. Transformar y extraer plásmido PDA C3bot-CM2-Pentasilk.

2. Digerir PDA CM2 con Sap I, hacer la ligación con inserto C3bot. Transformar y extraer plásmido PDA C3bot-CM2, digerirlo con Ear I, hacer la ligación con PDA Pentasilk (Sap I). Transformar y extraer plásmido PDA C3bot-CM2-Pentasilk.

5.1.2. Construcción del plásmido de estrategia B

PDA Pentasilk-CM2-C3bot

También hay dos esquemas:

1. Digerir PDA C3Bot con Sap I, hacer la ligación con inserto CM2. Transformar y extraer plásmido PDA CM2- C3bot, digerirlo con Sap I, hacer la ligación con inserto Pentasilk. Transformar y extraer plásmido PDA Pentasilk-CM2-C3bot.

2. Digerir PDA CM2 con Sap I, hacer la ligación con inserto Pentasilk. Transformar y extraer plásmido PDA Pentasilk-CM2, digerirlo con Ear I, hacer la ligación con PDA C3bot (Sap I). Transformar y extraer plásmido PDA Pentasilk-CM2-C3bot.

5.1.3. Construcción del plásmido de estrategia C

PDA C3bot-CM2-Pentasilk-CM2-C3bot

Para llevar a cabo de forma más conveniente. Se utiliza los plásmidos obtenidos de estrategia A y B. Hay dos esquemas:

1. Digerir PDA C3bot con Sap I, hacer la ligación con inserto CM2. Transformar y extraer plásmido PDA CM2-C3bot, digerirlo con Sap I, hacer la ligación con inserto C3bot-CM2-Pentasilk (estrategia A). Transformar y extraer plásmido PDA C3bot-CM2-Pentasilk-CM2-C3bot.

2. Digerir PDA Pentasilk-CM2-C3bot (estrategia B) con Sap I, hacer la ligación con inserto C3bot-CM2 (en proceso de estrategia A). Transformar y extraer plásmido PDA C3bot-CM2-Pentasilk-CM2-C3bot.

La factibilidad:

Normalmente la velocidad de la reacción de ligación depende del tamaño de inserto y de vector.

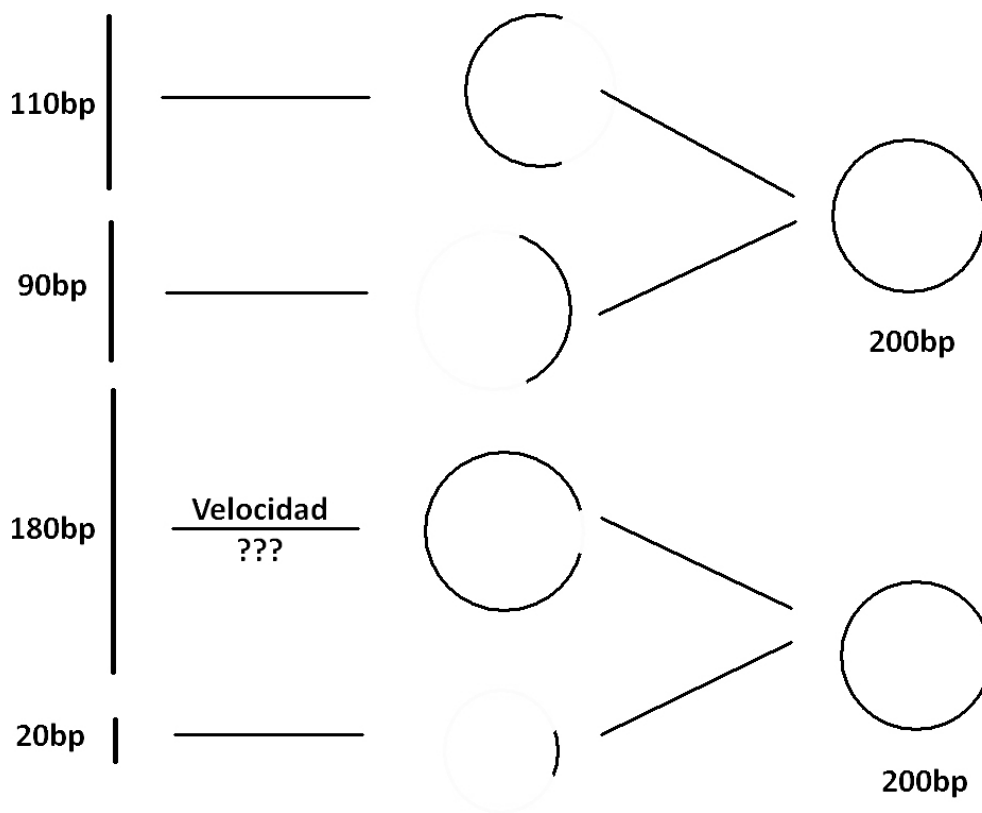


Fig.8 La formación plasmídica de ligación

Para obtener un plásmido recombinante, los dos extremos de un fragmento de DNA lineal tienen que “encontrar” los extremos del otro fragmento para que se unan (Fig.8). Cuando el tamaño de un fragmento es grande en la ligación, no es fácil que “encuentre” el fragmento pequeño por su complejidad. La existencia de un fragmento demasiado grande restringe la velocidad de la reacción como si necesitara más “energía de activación”. En conclusión, es mejor hacer la ligación entre dos fragmentos de tamaño similar o fragmentos pequeños.

Así podemos elegir los esquemas óptimos para llevar a cabo, son:

Esquema 2 de la **estrategia A**.

Esquema 2 de la **estrategia B**.

Esquema 1 de la **estrategia C**.

5.2. Síntesis de plásmidos

5.2.1. Síntesis del plásmido de estrategia A

Elegimos esquema 2 para la síntesis de PDA C3bot-CM2-Pentasilk.

La dificultad es introducir el inserto C3bot-CM2 al vector Pentasilk. Aunque el inserto es un fragmento de combinación, todavía es muy pequeño respecto al vector cuyo tamaño es de 8k bp. Y el resultado lo confirmó, solo salió una colonia positiva. Lo comprobamos por la secuenciación de DNA.

Además, cuando hacíamos la digestión de PDA C3bot-CM2 con Ear I, solo salió 4 bandas (normalmente 5), faltaba la banda de inserto. Luego recalculamos el tamaño de los fragmentos generados por vector PDA vacío digiriendo con Ear I, resultó que había superposición de la banda de inserto C3bot-CM2 (252 bp) y un fragmento de vector PDA (250 bp). Para separar las dos bandas, pensábamos que la doble digestión puede ser la solución. Es decir, digerir ese fragmento de 250 bp para que se convierta en 2 o más fragmentos pequeños. La selección de la enzima debe cumplir un requisito importante, que no va a generar otras bandas cuyo tamaño sea de unos 250 bp.

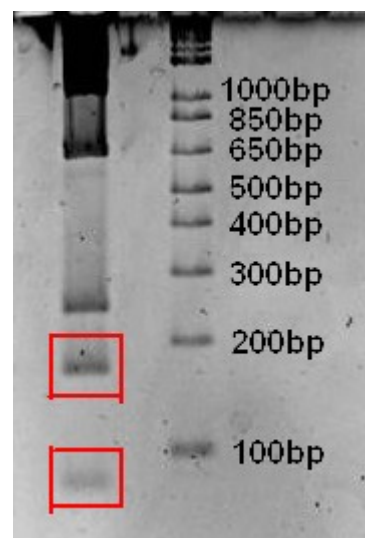
Al final elegimos la enzima Xba I, una enzima de digestión funciona en condición normal. Solo tiene 1 sitio de corte que se encuentra en el fragmento de vector PDA de 250 bp, hace que el dicho fragmento se convierta en un fragmento de 80 bp y uno de 170 bp (Fig.9). Para realizar una reacción completa, digerimos PDA C3bot-CM2 circular con Xba I a la condición indicada y hacer un análisis de la digestión. Si este sitio de plásmido es digerido totalmente, la conformación plasmídica debería ser lineal. Y luego se digirió con Ear I e hicimos la purificación del inserto.

Fig.9 Digestión con Ear I de PDA C3bot-CM2 (Xba I)

Dos fragmentos generados:

170 bp

80 bp



La ligación de inserto C3bot-CM2 y vector PDA Pentasilk (Sap I) fue más difícil que pensábamos. Después de transformar el plásmido recombinante en las bacterias de tipo *XL-1 Blue Competent Grade*, se inocularon en las placas de cultivo donde contenían ampicilina y kanamicina (el plásmido pDrive ALL les confería la resistencia a dichos antibióticos). Entonces sólo las bacterias en las que fue introducido el plásmido podrían vivir y proliferar. Luego inoculamos las colonias crecidas en medio de cultivo para que crecieran. Extrajimos sus plásmidos y los analizamos. Aunque todas las bacterias crecidas tenían pDrive ALL, no todos poseían el fragmento C3bot-CM2-Pentasilk. Y menos mal hemos podido conseguir una colonia. Mandamos una muestra de este plásmido a secuenciación con promotor T7 (lee la secuencia desde el sitio Sap I hasta la distorsión de la señal), el resultado salió bien. La técnica de secuenciación tiene muchas limitaciones, normalmente puede secuenciar unos 500 bp, también

depende de la pureza de la muestra. La secuencia de la parte C3bot y CM2 demostró que estaba intacta. No se ha podido secuenciar totalmente la parte Pentasilk ya que es un fragmento grande y muy repetitivo. Si el producto de proteína tiene las propiedades de elastina, podríamos decir que la secuencia de la parte Pentasilk está bien.

5.2.2. Síntesis del plásmido de estrategia B

La síntesis del gen PDA Pentasilk-CM2-C3bot fue más sencilla comparando con la de estrategia A. Es que en todas las ligaciones realizadas, el tamaño de fragmento y vector siempre era muy parecido:

Ligación 1: Inserto de Pentasilk (4,1 kbp) en vector PDA CM2 (4,0 kbp).

Ligación 2: Inserto de Pentasilk-CM2 (4,2 kbp) en vector PDA C3bot (4,0 kbp).

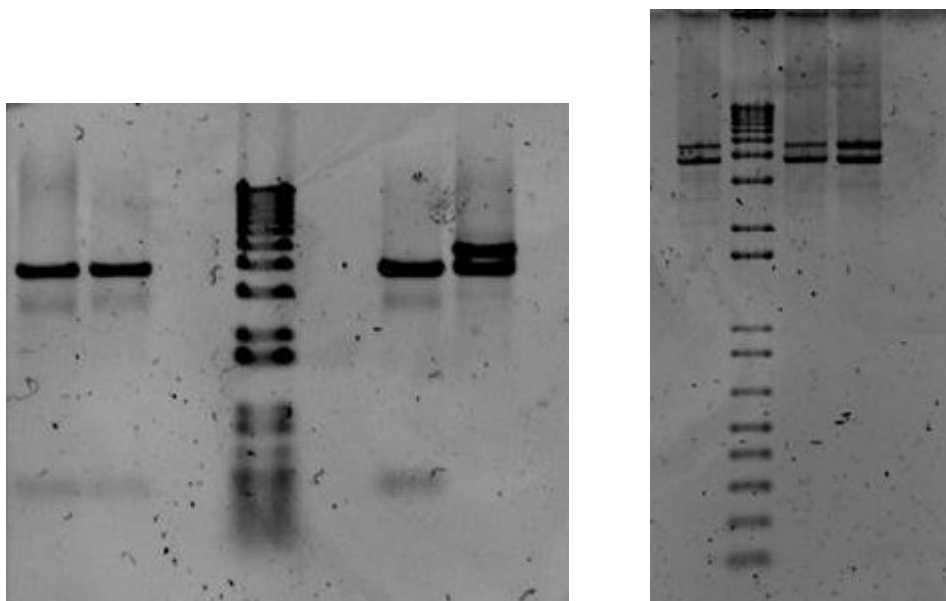


Fig.10 La digestión con FastDigest EcoR I (una enzima de diagnóstico) de PDA C3bot-CM2-Pentasilk (izquierda) y de PDA Pentasilk-CM2-C3bot (Derecha). Solo la cuarta digestión de PDA C3bot-CM2-Pentasilk salió positiva.

Hemos mandado las 3 muestras de PDA Pentasilk-CM2-C3bot (en Fig.10) para secuenciar. Como importábamos más la integridad de la parte CM2 y C3bot, se secuenciaron con promotor Sp6 (del sentido opuesto), y las secuencias de todas las muestras fueron buenas.

5.2.3. Síntesis del plásmido de estrategia C

La síntesis de plásmido PDA C3bot-CM2-Pentasilk-CM2-C3bot siempre se lleva a cabo al final ya que son utilizados los materiales de estrategia A o B. Elegimos la esquema 1 para su generación, que necesitaba un inserto C3bot-CM2-Pentasilk (el plásmido de estrategia A digerido con Ear I) y un vector PDA CM2-C3bot (digerido con Sap I).

Cometimos un error utilizando el vector que pensábamos que era vector PDA CM2-C3bot y creíamos que había sido utilizado en la estrategia B. De hecho la estrategia B la hicimos de manera de esquema 2, no había sido sintetizado el plásmido PDA CM2-C3bot que imaginábamos en esquema 1. Y cuando llegó las secuencias de plásmidos, ya estaba al final del proyecto. Es una pena que no hayamos podido repetirlo.

Teóricamente para sintetizar plásmido PDA C3bot-CM2-Pentasilk-CM2-C3bot con inserto de estrategia A, hay que construir un plásmido PDA CM2-C3bot. Se puede digerir plásmido PDA CM2 con Ear I, y insertar este fragmento ligando en vector PDA C3bot (digerido con Sap I). Luego se puede transformar y extraer plásmido PDA CM2-C3bot y digerirlo con Sap I. Y terminará una vez se ligue con inserto C3bot-CM2-Pentasilk obtenido de estrategia A.

5.3. Clonación del gen en vector de expresión

El vector utilizado en este proyecto es pET7 Rare (5 kbp), construido previamente a partir del vector pET-25b (+) de Novagen en mismo laboratorio.

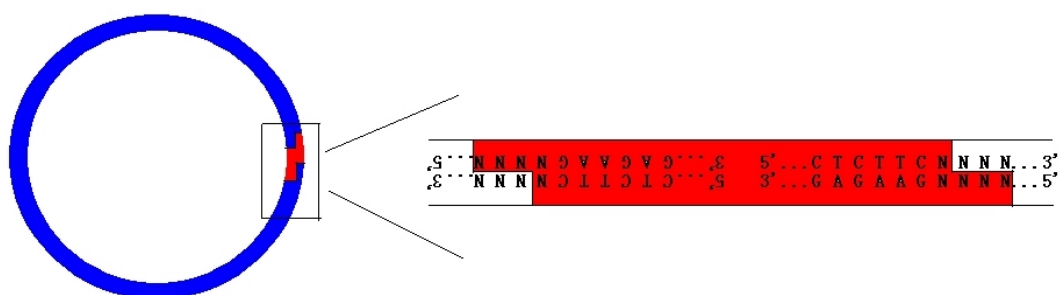


Fig.11 Patrón de la digestión de vector pET7 Rare con Sap I

La forma de digestión y la ligación en vector pET7 Rare es muy parecida a la de vector p Drive ALL. La única diferencia es que los sitios de reconocimiento de Sap I de vector pET7 Rare son eliminados cuando se digiere con Sap I ya que el sitio de reconocimiento enzimático no es su sitio de corte.

La eliminación de los sitios de digestión hace que el plásmido recombinante sea más resistente a las enzimas de restricción, aumenta la estabilidad plasmídica en la fase de expresión. Hoy en día esta manera se utiliza ampliamente en la ingeniería genética.

Los plásmidos recombinantes de pET7 Rare (pET7 Rare con fragmento C3bot-CM2-Pentasilk, pET7 Rare con fragmento Pentasilk-CM2-C3bot) fueron transformados en la cepa bacteriana *XL-1 Blue Competent Cells*, para obtener suficiente cantidad de plásmidos para la siguiente expresión de proteínas.

Después los plásmidos fueron purificados del cultivo celular de la manera indicada anteriormente (4.2.2).

5.4. Expresión proteica en las cepas bacterianas BLR y BL21

5.4.1. Transformación del plásmido recombinantes de pET7 Rare en las cepas bacterianas BLR y BL21

BLR y BL21 son las cepas bacterianas más utilizadas en la expresión de proteínas de tipo elastina, sobre todo el primero. Las diferencias principales obtenidas de experimentos son:

1. BLR expresa las elastinas de alto rendimiento. Es decir, cuando termine la expresión, el contenido de ELRs es mayor en BLR que en BL21.
2. BL21 tiene una mayor eficiencia de transformación que BLR. La cantidad de plásmidos para transformación es mucho menos en BL21 que en BLR. BL21 solo necesita un par de nanogramos para que los plásmidos entren a las células, en el caso de BLR es más de 200 ng.

Si bien la eficiencia de transformación de BLR es baja, la elegimos como el preferido. La insuficiencia de eficiencia puede ser compensada añadiendo más plásmidos. Y la gran cantidad de plásmidos se pueden obtener mediante la subclonación plasmídica.

Después del crecimiento por toda la noche, en las placas de cultivo separadas ya han crecido las colonias de BLR y BL21 que contienen gen C3bot-CM2-Pentasilk o Pentasilk-CM2-C3bot.

5.4.2. Expresión de proteínas de las dos cepas

5.4.2.1. Primer análisis de las proteínas expresadas

La fórmula de medio TB es diseñada para la expresión proteica. Por supuesto las bacterias crecidas en medio LB también expresan proteínas cuando hacíamos la subclonación, la diferencia es la tasa de expresión proteica.

Un microanálisis se realiza con las bacterias cultivadas por toda la noche en medio TB que contiene ampicilina (plásmido pET7 Rare tiene gen resistente a ampicilina) y/o cloranfenicol (para BL21) y/o tetraciclina (para BLR).

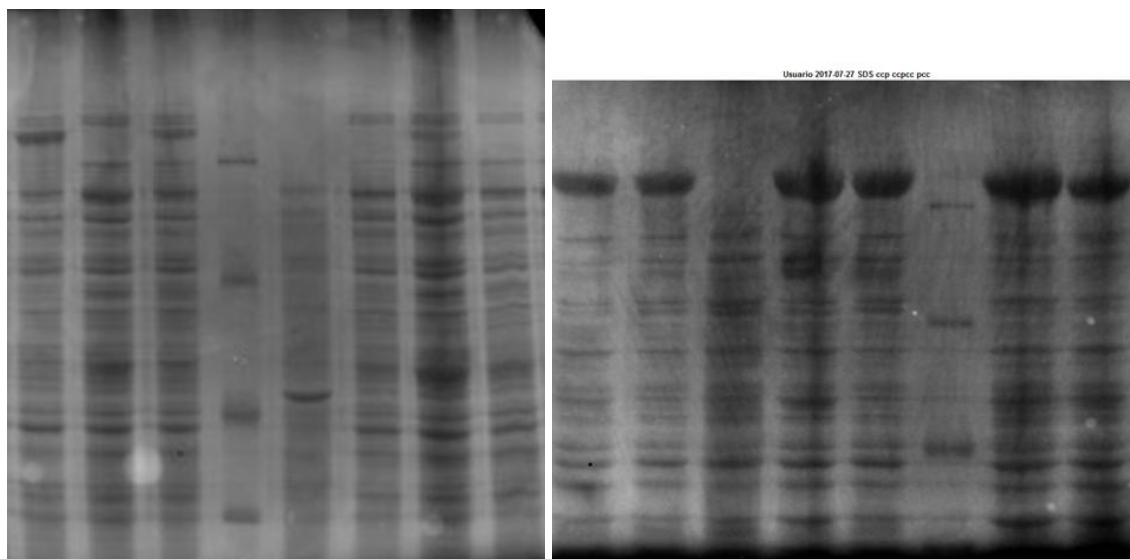


Fig.12 proteínas expresadas en las cepas bacterias

Izquierda: BL21 con C3bot-CM2-Pentasilk (1, 2, 3) y con Pentasilk-CM2-C3bot (6, 7, 8), la cuarta columna: marcador proteico (el marcador más superior indica un tamaño de 90 kDa), la quinta: control de BL21.

Derecha: BLR con C3bot-CM2-Pentasilk (1, 2) y con Pentasilk-CM2-C3bot (7, 8), la sexta columna: marcador proteico (el marcador más superior indica un tamaño de 90 kDa), la tercera: control de BLR.

Todas las bacterias de BL21 o BLR que contengan los plásmidos recombinantes han expresado los ELRs exitosamente (menos el grupo de plásmidos de estrategia C), el tamaño de todos los ELRs es superior a 90 kDa, que coincide con el tamaño imaginábamos anteriormente (128 kDa).

5.4.2.2. Expresión proteica en medio de cultivo de gran cantidad (Producción de proteínas para purificación)

Las células fueron inoculadas en 5 mL de medio LB que contenía antibióticos y glucosa, se ponen a 37 °C con agitación orbital (250 rpm). Después del crecimiento

celular de 4-6 h se inocularon en matraz de Erlenmeyer de 2 L dentro hay 500 mL de medio TB que contenía antibióticos correspondientes. Se cultivaron por toda la noche hasta la densidad óptica (O. P.) está entre 4-10 (medir la absorbancia relativa a 600 nm con espectrofotometría).

Tras el lavado de las células, se rompieron con el sonicador en el tampón de sonicación y se añadieron todos los inhibidores de proteasas a la concentración 1X. Los siguientes pasos **siempre llevan a cabo a 4 °C**.

1. Centrifugar el lisado a 14.000 rpm, 4 °C, 40 min.
2. Almacenar el sobrenadante. Ajustar el pH agitado con imán hasta que llegue a 3,5 - 3.6 con HCl (1M). Cuando alcance el pH, mantener agitando a 4 °C 20 min.
3. Centrifugar a 14.000 rpm, 4 °C, 15 min.
4. Añadir al sobrenadante sulfato de amonio de cantidad correspondiente a 15% de peso de sobrenadante e incubar 10 min a 4 °C.
5. Centrifugar a 14.000 rpm, 4 °C, 15 min y desechar el sobrenadante. Resuspender la precipitación (producto) en agua MQ
6. Repetir los pasos 3-5 dos veces.
7. Dializar 3 veces frente a agua (25 L destilada, 25 L destilada, 25 L MQ)
8. Ajustar pH a 7,5 y filtrar con filtros de 0,22 µm y congelar para liofilizar.

No hemos podido realizar todos los pasos por la limitación de tiempo. En general, la tasa de rendimiento depende de la cantidad de las bacterias utilizadas, la operación de los pasos de purificación y las condiciones de reacciones.

6.- CONCLUSIONES

- Se ha realizado la construcción de los genes recombinantes que lleva fragmentos de Pentasilk y C3bot en vector de clonación pDrive ALL. Para que el fragmento bioactivo C3bot pueda ser funcional in vivo, se ha interpuesto una secuencia que contiene motivos diana de proteasas específicas del tejido neuronal. Los plásmidos obtenidos son **pDA C3bot-CM2-Pentasilk** y **pDA Pentasilk-CM2-C3bot**. El orden de los fragmentos afecta la tasa de éxito en la construcción.

- Se ha llevado a cabo la introducción de los insertos de DNA **C3bot-CM2-Pentasilk** y **Pentasilk-CM2-C3bot** que codifican las proteínas ELRs en el vector de expresión pET7 Rare y fueron transformados en las cepas bacterianas de expresión: BLR y BL21.

.

- Se han producido en BLR y BL21 las proteínas de ELRs, que además de tener la estructura de elastina, también el efecto de regeneración neuronal. Sobre todo en BLR el rendimiento proteico es significativo.

7.- BIBLIOGRAFÍA

1. 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 co-Recombinamer with a Concomitant Dual Physical Gelation Process. *Biomacromolecules*, **2014**, 15, 3781-3793.
2. Dinerman, A. A.; Cappello, J.; Ghandehari, H.; Hoag, S. W. *Biomateriales*, **2002**, 23, 4203-4210.
3. Loske P, Boato F, Hendrix S, Piepgras J, Just I, Ahnert-Hilger G, Höltje M. *JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY*. **2012**, 120, 1084-1096.
4. Alessandra Girotti, Alicia Fernández-Colino, Isabel M. López, José C. Rodríguez-Cabello and Francisco J. Arias. Elastin-like recombinamers: Biosynthetic strategies and biotechnological applications. *Biotechnol. J.* **2011**, 6, 1174-1186
5. Girotti A.; “Desarrollo de una plataforma biotecnológica para la obtención de polímeros recombinantes tipo elastina” PhD Thesis, **2007**.
6. Ribeiro A.; Functionality development in systems based on Elastin-like recombinamers: From nano-objects to macrogels. PhD Thesis, **2008**.