



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

**Síntesis y caracterización de polímeros recombinantes tipo elastina
para aplicaciones biomédicas**

***Autor:** Sandra Ramos Díez*

***Tutor/es:** Dra. Alessandra Girotti*

Dra. Raquel Muñoz Martínez

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo simboliza el final de una etapa inolvidable dedicada no sólo a desarrollar mi conocimiento científico, sino también a fomentar mi crecimiento como persona. Esta progresión me ha permitido conocer a personas maravillosas cuyas inquietudes son similares a las mías. A todos ellos les dedico este trabajo.

Muy especialmente a mis tutoras, Alessandra y Raquel, que durante este último año me han llevado de la mano.

A mis profesores del Grado en Química, que me han enseñado todo lo que sé.

A mis compañeros de laboratorio de BIOFORGE, en especial a Filippo y a Sara, por ser un ejemplo y por haber guiado mis pasos hacia lo que deseo que sea mi futuro profesional.

A BIOFORGE, por haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo; así como de hacerme amar un área de la Química que no hubiese conocido de no ser por ellos y a la que espero estar vinculada de por vida.

A todos mis amigos. Aunque somos un grupo muy heterogéneo, somos capaces de completarnos. Eso nos permitirá estar unidos siempre por el amor a la Ciencia.

A toda mi familia, por darme tanto cariño y tantos buenos momentos. Sin vosotros no hubiese llegado hasta donde estoy, ni tendría tanta fuerza para perseguir mis sueños.

*“Un país sin investigación,
es un país sin desarrollo”*

Severo Ochoa

*“Siento menos curiosidad por la
gente y más curiosidad por las ideas”*

Marie Curie

ÍNDICE

1. RESUMEN/ABSTRACT	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. BIOQUÍMICA, INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOMATERIALES	2
2.2. CLONACIÓN DEL DNA.....	3
2.3. HERRAMIENTAS ENZIMÁTICAS DE CLONACIÓN.....	5
2.4. ELASTINA	6
2.4.1. <i>Polímero tipo elastina (ELP)</i>	7
2.4.2. <i>Polímero recombinante tipo elastina (ELR)</i>	8
2.5. ENCAPSULAMIENTO DE FÁRMACOS Y VEHICULIZACIÓN MICELAR.....	9
2.5.1. <i>Anticuerpos ScFv</i>	11
3. OBJETIVOS	12
4. MATERIALES Y MÉTODOS	13
4.1. MATERIALES	13
4.1.1. <i>Reactivos químicos</i>	13
4.1.2. <i>Disoluciones tamponadas</i>	14
4.1.3. <i>Materiales de biología molecular</i>	14
4.1.3.1. Cepas bacterianas.....	14
4.1.3.2. Medios de cultivo bacteriano	15
4.1.4. <i>Proteínas</i>	15
4.1.4.1. Enzimas de restricción.....	15
4.1.4.2. Otras enzimas.....	16
4.1.5. <i>Vectores plasmídicos</i>	17
4.1.5.1. Vector de clonación.....	17
4.1.5.2. Vector de expresión	17
4.1.6. <i>Plásmidos empleados para la síntesis de genes</i>	18
4.1.6.1. pHTQ-ScFv	18
4.1.6.2. pDA-(EI)x2.....	18
4.1.7. <i>Kits de purificación y extracción de DNA</i>	19
4.2. MÉTODOS	19
4.2.1. <i>Electroforesis de DNA en geles de agarosa</i>	19
4.2.1.1. Electroforesis analítica	21
4.2.1.2. Electroforesis preparativa	22
4.2.2. <i>Evaluación y análisis de los fragmentos de DNA</i>	22
4.2.3. <i>Determinación y análisis de la concentración y pureza de las muestras de DNA</i>	22
4.2.4. <i>Purificación de plásmidos</i>	24
4.2.4.1. Purificación de DNA plasmídico de cepas bacterianas (E. coli).....	24
4.2.4.1.1. Protocolo NucleoSpin® Plasmid/Plasmid NoLid.....	24

4.2.4.1.2.	Protocolo Quantum Prep® Plasmid MidiPrep Kit.....	26
4.2.4.2.	Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa. Protocolo PureLink™ Quick Gel Extraction Kit.	26
4.2.5.	Digestión de DNA mediante enzimas de restricción	27
4.2.6.	Tratamiento de DNA con enzimas de defosforilación	28
4.2.7.	Reacción de ligación.....	28
4.2.8.	Preparación de placas de cultivo bacteriano.	29
4.2.9.	Transformación de cepas bacterianas	29
4.2.9.1.	Transformación con BLR (DE3) Competent Cells.....	30
4.2.9.2.	Transformación con XL1-Blue Subcloning Grade Cells	30
4.2.9.3.	Transformación con XL1-Blue Competent Grade Cells.....	30
4.2.9.4.	Transformación con NZY5α Competent Grade Cells	31
4.2.10.	Secuenciación del DNA.....	31
4.2.11.	Bioproducción de polímeros recombinantes.....	31
4.2.12.	Aislamiento de polímeros recombinantes.....	33
4.2.13.	Purificación de polímeros recombinantes.....	34
4.2.14.	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	36
4.2.15.	Caracterización fisicoquímica de polímeros recombinantes.....	38
4.2.15.1.	Espectrometría de masas (MALDI-TOF).....	38
5.	<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	40
5.1.	CONSTRUCCIÓN DE GENES QUE CODIFICAN LOS ELR	40
5.1.1.	Descripción de la construcción del gen pDA-ScFv-(EI)x2.....	40
5.1.2.	Descripción de la construcción del gen pET7-ScFv-(EI)x2.....	43
5.2.	SÍNTESIS EXPERIMENTAL DE GENES RECOMBINANTES.....	44
5.2.1.	Amplificación del plásmido pHTQ-ScFv.....	44
5.2.2.	Escisión del inserto ScFv a partir del plásmido pHTQ-ScFv	45
5.2.3.	Amplificación y linealización del plásmido pDA-(EI)x2.....	46
5.2.4.	Reacción de ligación del plásmido linealizado pDA-(EI)x2 y del inserto ScFv.....	47
5.2.5.	Reacción de ligación del plásmido linealizado pET7 y del inserto ScFv-(EI)x2.....	49
5.3.	BIOPRODUCCIÓN DE ELR	50
5.3.1.	Aislamiento del recombinámero.....	52
5.3.2.	Primera etapa de purificación: calentamiento	52
5.3.3.	Segunda etapa de purificación: enfriamiento.....	53
6.	<u>CONCLUSIONES</u>	55
7.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	56
8.	<u>ABREVIATURAS</u>	58

1. RESUMEN

Una de las proteínas de gran interés en la ciencia de los materiales es la elastina debido a sus propiedades elásticas y resistentes. El análisis de la estructura de la elastina reveló el secreto de sus cualidades fisicoquímicas y suscitó el interés por la síntesis de polímeros sintéticos recombinantes tipo elastina (ELR) obtenidos mediante ingeniería genética. Estos biopolímeros pueden desempeñar multitud de funciones y tienen una elevada biocompatibilidad, por lo que se trata de materiales multipotentes en el campo de los Biomateriales y de la Biomedicina.

En este trabajo se ha sintetizado y purificado el recombinámero tipo elastina ScFv-(EI)x2 cuya secuencia de aminoácidos determina su estructura micelar en disolución acuosa y su bifuncionalidad. La producción del polímero ScFv-(EI)x2 se ha llevado a cabo empleando técnicas de Ingeniería genética y se ha caracterizado fisicoquímicamente mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Para su síntesis se han utilizado diferentes cepas de la bacteria *Escherichia coli* debido a su sencilla maquinaria de replicación y traducción del DNA.

ABSTRACT

One of the proteins of great interest to researchers is elastin, due to its elastic and resistant properties. The analysis of the structure of elastin reveals the secret of its physicochemical qualities and sparked interest in the synthesis of recombinant synthetic elastin-like recombinamers (ELR) obtained by genetic engineering. These biopolymers can perform a multitude of functions and possess high biocompatibility, making them multipotent materials in the field of Biomaterials and Biomedicine.

In this work, the ELR ScFv-(EI)x2 has been synthesized and purified, whose amino acid sequence determines its micellar structure in aqueous solution and its bifunctionality. The production of the ScFv-(EI)x2 polymer has been carried out using genetic engineering techniques and has been physicochemically characterized by polyacrylamide gel electrophoresis. Different strains of *Escherichia coli* bacteria have been used for its synthesis due to their simple machinery for DNA replication and translation.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. BIOQUÍMICA, INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOMATERIALES

En las últimas décadas han surgido nuevas disciplinas científicas que surgen del estudio en conjunto de diferentes ramas de conocimiento. Este hecho ha provocado que las fronteras entre dichas ramas se encuentren cada vez más difuminadas. Ejemplo de ello es la ciencia de los materiales para aplicaciones biomédicas en la cual se precisa de la actuación conjunta de científicos de diferentes áreas de las ciencias técnicas, de la ingeniería y de las ciencias de la vida.

La Biología molecular es la disciplina científica cuyo dominio da explicación a los procesos que ocurren en el interior de la célula en base a la estructura y la función de las principales moléculas que la conforman: ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, glúcidos. El dogma de la Biología molecular (*Figura 1*) se basa en el modo en que se realiza el flujo de la información genética. El DNA es la molécula que almacena y transmite esa información. El ácido desoxiribonucleico (DNA) se transcribe para dar lugar a la molécula de ácido ribonucleico (RNA) y éste se traduce con el fin de sintetizar proteínas.

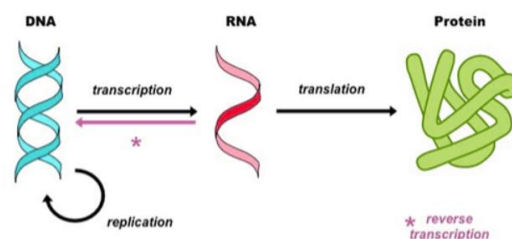


Figura 1. Representación esquemática del dogma de la Biología molecular.

La Ingeniería genética estudia y aplica el conjunto de técnicas y métodos que son empleados para la manipulación y la selección del DNA. Mediante esta disciplina se puede conseguir la creación de genes con unas características específicas y la implantación de éstos en células huésped de numerosos organismos.

Los **biomateriales** se definen como sustancias naturales o sintéticas (diferentes a un medicamento) que pueden ser usadas por un determinado período de tiempo como parte de un sistema, el cual trata de curar, mejorar o reemplazar un órgano, un tejido o una función del cuerpo¹. Estas sustancias, por lo tanto, resultan idóneas para su implante en contacto directo con tejidos vivos, pues están diseñadas para ese fin². Para que un material sea considerado inocuo para el ser vivo con el que está en contacto debe cumplir una serie de requisitos tales como que sea químicamente estable, que no sea tóxico, que no cause rechazo por el sistema inmune y que posea buenas características mecánicas.

El gran avance en la síntesis de biomateriales en las últimas décadas ha obligado a realizar una clasificación de los mismos atendiendo a diversos aspectos³. Así, se obtiene la organización mostrada en la *Figura 2*.

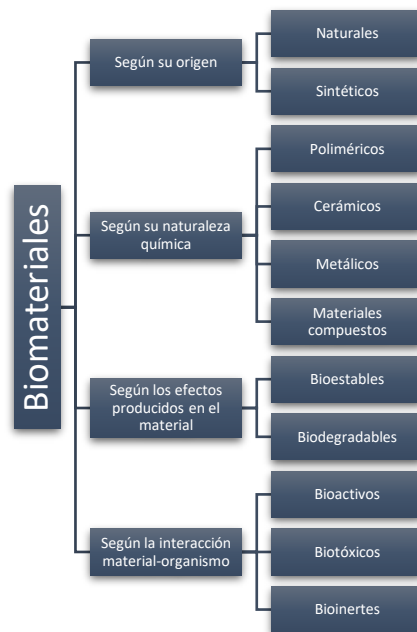


Figura 2. Clasificación de los biomateriales en función de diferentes aspectos.

Entre los distintos biomateriales se encuentran los polímeros. Un polímero es una sustancia química que se sintetiza a partir de la polimerización de pequeñas unidades denominadas monómeros. La posibilidad de poder escoger entre multitud de combinaciones de éstos nos permite la facultad de obtener un biomaterial con unas características extremadamente concretas. Así, el hecho de que dicho polímero sea biodegradable y bioactivo indica que éste interactuará positivamente en el organismo en que se implante y que, tras cumplir su función, será metabolizado por dicho ser vivo hasta su completa eliminación.

2.2. CLONACIÓN DEL DNA

Con el fin de obtener polímeros proteicos, recientemente se ha utilizado una estrategia basada en la síntesis empleando microorganismos (biosíntesis). En ella se utilizan microorganismos que actúan como biorreactores, pues en ellos se introduce la información genética precisa para la obtención del material sintético deseado. Este proceso se lleva a cabo mediante la clonación del DNA.

La clonación del DNA es una técnica de la Ingeniería genética que permite la obtención de copias idénticas de un determinado gen. En este caso, el gen que se pretende amplificar es el que codifica para nuestro polímero recombinante tipo elastina. Este gen se denomina de

manera general 'inserto'. El proceso de clonación tiene distintas etapas, las cuales se muestran en la *Figura 3*.

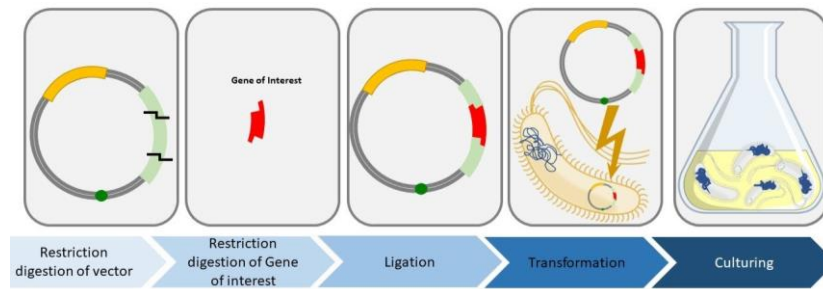


Figura 3. Representación esquemática de las diferentes etapas de la clonación de DNA.

En la primera etapa, se identifica o sintetiza el gen que se pretende amplificar y se aísla del resto con el fin de realizar una clonación controlada.

A continuación, este gen debe ser extraído del cromosoma en el que se encuentre. Este procedimiento se denomina digestión enzimática y purificación del DNA.

Una vez hemos obtenido el fragmento de DNA deseado (coloreado en rojo en la *Figura 3*), éste debe ser unido a un vector plasmídico. Este proceso se denomina ligación. Los vectores plasmídicos son moléculas de DNA de pequeño tamaño, fáciles de aislar y caracterizar, que poseen una secuencia y mapa de restricción conocido. Éstos pueden introducirse en la célula huésped de manera sencilla y tienen capacidad de autorreplicarse con independencia del DNA de la célula huésped. Estos vectores además contienen un gen que confiere resistencia a un antibiótico con el fin de poder seleccionar las células que han introducido el vector. Las células que posean el vector con un gen marcador de resistencia a antibióticos serán capaces de sobrevivir en un medio que contenga dicho antibiótico.

Una vez se ha construido el plásmido que contiene el gen recombinante, éste debe introducirse en una célula huésped a través de la transformación (*Figura 3*). Dentro de la célula huésped se produce la amplificación de dicho fragmento génico; es decir, se obtienen gran cantidad de copias del mismo de manera precisa y selectiva. Tras la comprobación del éxito del clonaje, el gen se transfiere a otro vector, cuya función es maximizar la producción del producto de interés, llamado vector o plásmido de expresión. Esto significa que se emplean para elevar la capacidad de síntesis de nuestro polímero recombinante por parte de la célula huésped. La elección del hospedador resulta de suma importancia. En este caso, interesa la denominada transformación bacteriana debido a su sencillez, al amplio conocimiento de los procesos de regulación de la replicación bacteriana, la fácil obtención de las células huésped, junto con su rápido y sencillo cultivo.

Finalmente, las células bacterianas que contienen el gen recombinante son cultivadas en un medio adecuado para conseguir la amplificación de dicho gen.

El éxito o el fracaso de una clonación depende estrechamente de la longitud respectiva del vector plasmídico y del inserto. Para que este proceso tenga lugar de manera rápida y eficaz es preciso que ambos componentes tengan un tamaño adecuado. La razón de que la velocidad de la reacción de ligación se vea influenciada por su tamaño se debe a las múltiples conformaciones que posee un fragmento de DNA largo (vector plasmídico) con respecto a uno corto (inserto). A mayor número de conformaciones, menor es la probabilidad de que sus dos extremos se encuentren en la orientación adecuada para la ligación con el inserto (*Figura 4*). El número de conformaciones posibles del fragmento de DNA se conoce en Termodinámica estadística como el número de microestados de la molécula. Mediante el postulado de Boltzmann es posible relacionar una propiedad microscópica de la materia, como el número de microestados, con una propiedad macroscópica como la entropía (*Ecuación 1*).

$$S = k_B \cdot \ln \Omega$$

Ecuación 1. Ecuación de Boltzmann de la mecánica estadística.

donde **S** es la entropía de la molécula; **k_B** es la constante de Boltzmann; y **Ω** es el número de microestados.

Con esta relación se concluye que a medida que, el número de microestados de un sistema aumenta, también lo hace su entropía. Esto significa que existirá un mayor “desorden energético” a nivel microscópico y, como consecuencia, el estado en el que la molécula se encuentra con ambos extremos orientados en una posición correcta para aceptar el inserto es más improbable.



Figura 4. Esquema de una reacción de ligación en función de la longitud del vector y del inserto.

2.3. HERRAMIENTAS ENZIMÁTICAS DE CLONACIÓN

Con el fin de poder manipular fragmentos concretos de DNA mediante las técnicas de Ingeniería genética es preciso poder “cortar y pegar” fracciones de material genético a nuestro antojo. Esta función es realizada por un grupo de enzimas denominadas enzimas de restricción y enzimas de modificación. Además, uno de los pasos más importantes en el clonaje de genes recombinantes es la correcta digestión y unión de los vectores plasmídicos y de los insertos. La digestión de fragmentos de DNA también es realizada por enzimas de restricción o endonucleasas.

Éstas son proteínas que poseen actividad catalítica nucleasa, lo que implica que son capaces de incrementar la velocidad de la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster que unen a los

nucleótidos de una cadena de DNA. Estas enzimas provocan el corte de una secuencia de DNA en un lugar específico denominado sitio de reconocimiento específico o secuencia diana, y es particular de cada una de las enzimas de restricción.

Las fracciones de DNA que resultan tras la actuación de las endonucleasas se denominan fragmentos de restricción y el número de fragmentos resultante depende de cuántos sitios de reconocimiento específicos tenga éste.

Estas enzimas de restricción (*apartado 4.1.4.1.*) se nombran empleando tres letras del género y de la especie de la bacteria en la que se aislaron por primera vez, seguido por un número romano que las diferencia en función de su distinta especificidad. Ejemplo de ello es la enzima *EcoRI* (*Escherichia coli*). La letra R identifica el serotipo de la bacteria de la que se extrajo originalmente. El diferente serotipo marca los antígenos que tiene la célula procariota en cuestión.

Dependiendo de cómo sean los extremos que se generan en una digestión, se pueden distinguir dos tipos de sitios de reconocimiento específico: extremos romos o extremos cohesivos (*Figura 5*). Los extremos romos son aquellos que no generan desapareamiento en las bases nitrogenadas. Sin embargo, los extremos cohesivos son aquellos que generan desapareamiento de entre dos y cuatro bases nitrogenadas, por lo que únicamente podrán clonarse con extremos compatibles (con complementariedad de bases nitrogenadas).



Figura 5. Representación de extremos romos y cohesivos de una secuencia de nucleótidos generados por enzimas de restricción (*SmaI* y *EcoRI* respectivamente).

2.4. ELASTINA

La elastina es una proteína que se localiza en la matriz extracelular del tejido conjuntivo de los vertebrados.

La elastina se encuentra en el grupo de las holoproteínas ya que contiene únicamente aminoácidos. Además, según su estructura terciaria se trata de una proteína fibrilar. Las proteínas fibrilares son menos complejas que las globulares y, al contrario que éstas, son generalmente insolubles en medio acuoso. Por este motivo suelen tener un papel estructural en los tejidos de los que forman parte.

Su estructura primaria suele contener una gran proporción de aminoácidos hidrofóbicos. Una vez secretada en el espacio extracelular, se vuelve insoluble y se autoensambla para evitar la interacción con el agua del medio formando agregados y dando lugar a la estructura

cuaternaria de la elastina. Esta estructura polimérica en forma de haces es la responsable de la propiedad más destacada de dicha macromolécula: la elasticidad (*Figura 6*). La elastina puede estirarse hasta un 150% de su longitud en reposo sin romperse. De esta cualidad deriva el nombre de la elastina, del griego *elast(o)* que significa ‘golpeado’ o ‘dúctil’ e *in(a)* que significa ‘sustancia’⁴.

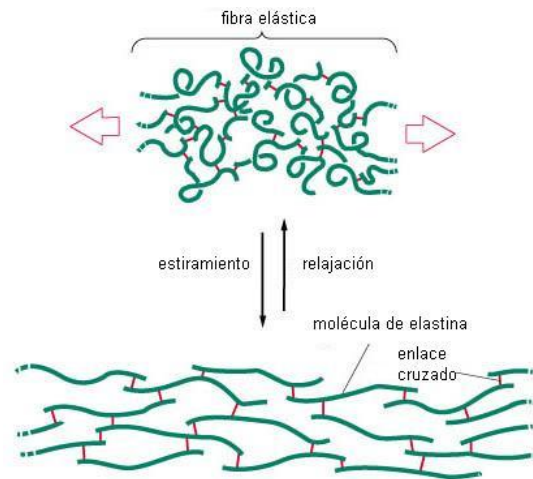


Figura 6. Representación esquemática de la estructura cuaternaria de la elastina y su ciclo de estiramiento-relajación.

Otra propiedad de la elastina que merece ser mencionada es la durabilidad de su estructura, puesto que se ha comprobado que la vida media de esta molécula ronda los 70 años⁵.

A propósito de las extraordinarias características físico-mecánicas de la elastina, numerosos investigadores centraron sus estudios en identificar la estructura primaria de esta molécula; es decir, su secuencia de aminoácidos⁶. Además de observar la presencia de numerosos aminoácidos hidrofóbicos, se detectó la repetición de un pentapéptido en concreto. Este patrón se repetía en hasta 50 ocasiones en una molécula de elastina y estaba compuesto por aminoácidos hidrofóbicos y neutros. El pentapéptido en cuestión resultó ser la secuencia Valina-Prolina-Glicina-Valina-Glicina (VPGVG en el código de representación de aminoácidos de una letra). Se supuso que es el responsable de las propiedades elásticas de la elastina y para comprobarlo, se sintetizó un polímero $(VPGVG)_n$ tal que $n \leq 150$ ⁷. Debido a los resultados positivos de dicho estudio, estos polímeros polipentapeptídicos se nombraron polímeros tipo elastina o ELPs por sus iniciales en inglés *elastin-like polymers*.

2.4.1. Polímero tipo elastina (ELP)

La característica más sorprendente de los ELPs $(VPGVG)_n$ es su solubilidad en medio acuoso. A diferencia de la elastina, estos biopolímeros naturales resultaron ser solubles en agua dependiendo de la temperatura⁸. A temperaturas inferiores a los 25°C son solubles, mientras que forman agregados y precipitan volviéndose insolubles en dicho medio a temperaturas

superiores. Este proceso, totalmente reversible, indica que la temperatura de transición de los ELPs estudiados es de 25°C. Por encima de esta temperatura el polímero adquiere propiedades elásticas y es capaz de deformarse sin romperse tras la aplicación de una fuerza sobre él.

Esta propiedad es común en todos los ELPs, aunque la temperatura de transición (T_t) varía según algunos parámetros tales como el número de repeticiones del patrón pentapeptídico (n) o el aminoácido que se encuentre en la cuarta posición (X) de dicho pentapéptido (VPGXV)⁹. Los estudios realizados por D.W. Urry revelaron que un aminoácido apolar en cuarta posición conseguía disminuir la temperatura de transición; mientras que uno polar la aumentaba¹⁰. También se determinó que el polipentapéptido (VPGPG)_n, en el que X es el aminoácido prolina (P), desestabilizaba la estructura de lámina plegada β del monómero de elastina, por lo que no era posible la formación de una estructura cuaternaria permanente¹¹.

Los biopolímeros tipo elastina producidos por este investigador junto con sus colegas fueron sintetizados mediante métodos químicos tradicionales tales como la síntesis de polipéptidos en fase sólida, también llamada síntesis de Merrifield. Es una síntesis relativamente laboriosa y permite sintetizar polipéptidos de longitud limitada. A medida que la longitud de los polipentapéptidos aumenta, disminuye la exactitud y se complica su purificación puesto que aparecen subproductos que afectan a las propiedades finales del ELP¹². Además, la ruta sintética química llevaba consigo otros problemas asociados tales como el uso obligado de disolventes orgánicos y su consiguiente eliminación para purificar el polímero resultante.

Estos inconvenientes forzaron a los investigadores a buscar una ruta alternativa para sintetizar dichos ELPs. La opción más segura y eficaz para producir estos polímeros pasaba por emplear la biosíntesis. Esta es guiada por una macromolécula de DNA recombinante que contiene “los planos” del ELP y realizada por microorganismos que poseen las herramientas para su síntesis, por lo que los ELP biosintetizados pasarían a denominarse recombinámeros tipo elastina o ELRs según sus iniciales en inglés ‘elastin-like recombinambers’.

2.4.2. Polímero recombinante tipo elastina (ELR)

Los recombinámeros tipo elastina (ELRs) tienen idéntica composición a los polímeros tipo elastina (ELPs) pero su síntesis es completamente diferente. La vía de los ELPs por biosíntesis puede controlarse de forma exhaustiva dando lugar a biopolímeros más puros y cuya síntesis sea más respetuosa con el medio ambiente. Esto se debe a que el proceso de purificación de los recombinámeros se basa en explotar la temperatura de transición de éstos, mediante la realización de varios ciclos de calentamiento-enfriamiento, en lugar de emplear repetidas extracciones con numerosos disolventes orgánicos.

La síntesis de los ELRs se lleva a cabo mediante la clonación de un gen recombinante para obtener copias idénticas del mismo y su posterior traducción para obtener la secuencia de aminoácidos del recombinámero. La construcción del DNA se lleva a cabo mediante la técnica de clonación *seamless* o clonación ‘sin costuras’ (Figura 7). Ésta permite el control absoluto de la secuencia final¹³.



Figura 7. Representación esquemática de la clonación *seamless* o clonación ‘sin costuras’.

2.5. ENCAPSULAMIENTO DE FÁRMACOS Y VEHICULIZACIÓN MICELAR

La mayoría de los medicamentos que se administran a un organismo con el fin de curar o prevenir alguna enfermedad, o incluso para aliviar un dolor físico, son moléculas orgánicas de pequeño tamaño tales como el paracetamol, el omeprazol o la simvastatina. Cuando estas moléculas se incorporan al riego sanguíneo suelen ser filtradas por el sistema excretor en su mayor parte y eliminadas en cuestión de minutos. Este proceso de detoxificación de los seres vivos reduce sustancialmente la eficacia de los fármacos de naturaleza tanto hidrofílica como hidrofóbica. Además, estos últimos necesitan ser administrados junto con otras sustancias químicas que aumenten la solubilidad de dichos medicamentos en el plasma sanguíneo, pues es el único modo en que los fármacos pueden absorberse y metabolizarse. Los compuestos químicos solubilizantes suelen tener un límite tolerable de exposición bastante bajo, por lo que su adición a estos fármacos debe estar regulada. Con el fin de solventar ambos problemas en la administración de medicamentos de naturaleza química hidrofóbica se están estudiando excipientes alternativos entre los que se encuentran los ELRs¹⁴.

La secuencia de aminoácidos de los recombinámeros, así como del resto de proteínas, determina la estructura final de los mismos, lo que afectará a la interacción con el vehículo para maximizar la encapsulación de fármacos. Por ello resulta de vital importancia el conocimiento de la estructura primaria del ELR que se ha sintetizado para poder precisar la aplicación biomédica que mejor se adapta a él. Así, para la construcción de nano-vehículos se ha determinado una estructura molecular del recombinámero tipo elastina con tres zonas: una de naturaleza hidrofóbica, una de naturaleza hidrofílica y otra cuya función es interactuar con las células para incrementar su eficacia y su seguridad. Por ello estos recombinámeros se denominan copolímeros de bloque o co-recombinámeros tipo elastina de bloques (ELbcRs por sus iniciales en inglés).

La polaridad de cada uno de los bloques (Figura 8) se debe a la influencia del cuarto aminoácido (X) del pentapéptido que conforma cada uno de ellos (VPGXG). En función de la naturaleza de dicho aminoácido, el bloque tendrá carácter hidrofóbico o hidrofílico¹⁵.



Figura 8. Estructura extendida y esquematizada del tetrabloque (EI)x2. Los bloques hidrofílicos se muestran en color azul y los bloques hidrofóbicos, en color rojo.

La doble polaridad del ELR proporciona la formación de micelas cuando este copolímero de bloque se encuentra en disolución acuosa. De acuerdo con dicha anfifilicidad, el extremo hidrofílico de cada molécula de recombinámero se orienta en el exterior de la micela (azul); mientras que el extremo hidrofóbico se encuentra embebido en el interior de ésta (rojo), tal y como se muestra en la *Figura 9*. La estabilidad de esta nanopartícula hueca está directamente relacionada con el tamaño de la molécula de recombinámero que lo compone. Así, se establece que una micela de ELR es estable siempre y cuando la molécula esté constituida por al menos 48 pentapéptidos¹⁶.

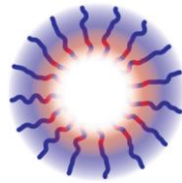


Figura 9. Representación esquemática de la micela formada por el tetrabloque en disolución acuosa.

Volviendo a la problemática de la escasa absorción de medicamentos hidrófobos y de pequeño tamaño molecular por los organismos vivos, el encapsulamiento de dichos fármacos en micelas ha demostrado ser una buena solución. Debido a la naturaleza hidrofóbica del corazón de la micela, la interacción con el medicamento está definida por fuerzas hidrofóbicas para evitar así el contacto con el agua. Además, la corona de la nanopartícula actúa como protección ante la filtración renal y la consiguiente metabolización del medicamento. De este modo, Chilkoti y sus colaboradores comprobaron que la permanencia en el organismo del medicamento protegido por la micela podía prolongarse durante al menos 10 horas más con respecto al fármaco sin encapsular¹⁷. Otra ventaja que presentan los recombinámeros tipo elastina es que su degradación no genera residuos tóxicos o que se puedan acumular en el organismo. Una vez han desempeñado su función se metabolizan siguiendo la correspondiente vía de degradación de las proteínas naturales y se eliminan completamente¹⁸.

2.5.1. Anticuerpos ScFv

El ScFv (anticuerpo monocatenario de fragmento variable) está constituido por el dominio variable pesado y el dominio variable ligero de un anticuerpo específico. Ambas regiones se encuentran unidas mediante un péptido flexible de pequeño tamaño (*Figura 10*) y su estructura está estabilizada por dos enlaces disulfuro¹⁹.

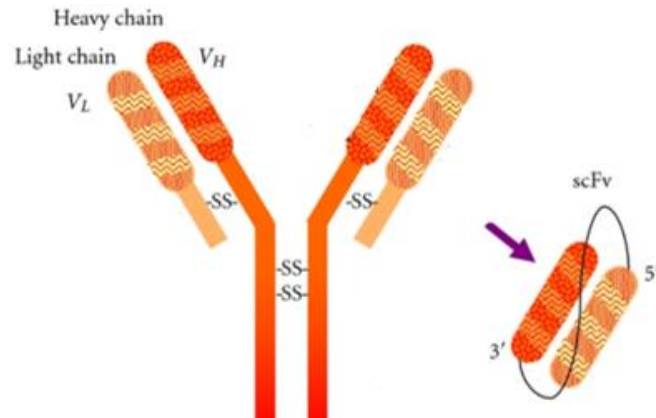


Figura 10. Representación esquemática de un anticuerpo (izquierda) y de un ScFv (derecha).

El uso de los anticuerpos ScFv tiene un número elevado de aplicaciones en el campo de la Biomedicina (desde terapias médicas hasta diagnóstico de enfermedades), lo que supone la necesidad de sintetizarlo de manera rápida y controlada. Por este motivo, la síntesis elegida por la mayor parte de los investigadores es la producción mediante técnicas de la Biología molecular y la Ingeniería genética²⁰.

Debido al potencial clínico del ScFv, se está estudiando su fusión con polímeros recombinantes tipo elastina con el fin de sintetizar anticuerpos con nuevas características bioactivas²¹. Además, se ha comprobado que para conseguir una eficiencia óptima en la síntesis de recombinámeros que contengan anticuerpos ScFv, la producción debe llevarse a cabo en bacterias del tipo *E. coli*²² debido a que esto aumenta la afinidad anticuerpo-antígeno. Todos los anticuerpos ScFv que forman parte de las moléculas de ELbcR se encuentran tapizando la superficie externa de la nanopartícula (micela bifuncionalizada²³).

3. OBJETIVOS

Debido a las propiedades de los recombinámeros tipo elastina, resulta oportuna la construcción de genes recombinantes y la consiguiente bioproducción de nuevos ELRs. El recombinámero que se pretende producir a lo largo de este trabajo se denomina ScFv-(EI)x2, y será un biomaterial natural, polimérico, biodegradable y bioactivo. Su secuencia viene determinada por la secuencia de nucleótidos de los genes que lo codifican teniendo en cuenta el código genético. Además, el organismo en que se implante este biopolímero posee mecanismos capaces de degradarlo, por lo que no es posible la acumulación de material exógeno en el individuo en el que se introduce.

El recombinámero tiene doble función ya que en disolución acuosa es capaz de formar micelas huecas cuya superficie se encuentra tapizada por anticuerpos ScFv. Por este motivo, el ELR sintetizado podrá utilizarse para encapsular fármacos hidrofóbicos en el interior micelar y dirigirlos hasta las células endoteliales vasculares del paciente, donde estos medicamentos serán liberados.

Para realizar la síntesis de DNA recombinante y la bioproducción del recombinámero ScFv-(EI)x2 se propone el siguiente plan de trabajo:

1. Emplear técnicas de la Ingeniería genética y de la Biología molecular para sintetizar un plásmido recombinante que sea capaz de expresar el recombinámero proteico ScFv-(EI)x2. Este proceso se llevará a cabo mediante clonación en células procariontas E. coli. Esta clonación incluye la extracción del inserto de un vector y la reacción de ligación de este inserto en un nuevo vector.
2. Producir el recombinámero ScFv-(EI)x2 a gran escala y purificarlo mediante ciclos de transición inversa.
3. Realizar una caracterización fisicoquímica del ELR sintetizado ScFv-(EI)x2 empleando distintas técnicas: SDS-PAGE y espectrometría de masa MALDI-TOF.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES

4.1.1. Reactivos químicos

Los reactivos químicos que se han utilizado se enumeran en el siguiente catálogo en orden alfabético.

- Acetato de magnesio.
- Acetato de potasio.
- Ácido acético.
- Ácido clorhídrico; HCl.
- Ácido etilendiaminotetraacético; EDTA.
- Acrilamida.
- Adenosín trifosfato; ATP.
- Albúmina sérica bovina; BSA.
- Ampicilina.
- Azul de bromofenol.
- Azul de Coomassie.
- Cloruro de cobre (II); CuCl_2 .
- Cloruro de magnesio; MgCl_2 .
- Cloruro de potasio; KCl.
- Cloruro de sodio; NaCl.
- Dimetilsulfóxido; DMSO.
- Ditioneitol; DTT.
- DNA Marker: 1 kbPlus DNA Ladder.
- Dodecilsulfato sódico; SDS.
- Etanol.
- Extracto de Levadura.
- Fluoruro de fenilsulfonilmetano; PMSF.
- Glicerol.
- Glucosa.
- Hidróxido de sodio; NaOH.
- Isopropanol.
- Kanamicina.
- Persulfato amónico; PSA.
- Polietilenglicol; PEG.
- SeaKem® LE Agarosa.
- SimplySafe™.
- Sulfato de magnesio; MgSO_4 .
- Tetrametilendiamina; TEMED o TMEDA.

- Triptófano.
- Tris(hidroximetil)aminometano; Tris.
- β -mercaptoetanol.

Cada uno de estos compuestos tendrá un papel experimental importante, lo cual se explicará a lo largo del trabajo.

4.1.2. Disoluciones tamponadas

La función que desempeñan estas soluciones es la de mantener el pH en un valor conocido, preciso y constante en todo momento. Las disoluciones tamponadas empleadas para la realización de la parte experimental de este trabajo aparecen en la siguiente lista, especificando en ella su composición química:

- **Buffer TAE (1x; 50x):** 40 mM Tris, 19 mM ácido acético, 1 mM EDTA; pH=7.5
- **DNA Loading Buffer 10x:** 10 mM Tris-HCl, 60 mM EDTA, 0.03% (v/v) azul de bromofenol, 60% (v/v) glicerol; pH=7.5.
- **SDS-PAGE Protein Loading Buffer 5x:** 10% (m/v) SDS, 25% (v/v) β -mercaptoetanol, 2% (v/v) azul de bromofenol (BPB), 50% (v/v) glicerol, 0.3 M Tris; pH=6.8.
- **Tango Buffer 10x (with BSA):** 33 mM Tris-acetato, 10 mM acetato de magnesio, 66 mM acetato de potasio, 0.1 mg/mL albúmina sérica bovina (BSA); pH=7.9.
- **Buffer SAP 10x:** 50 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$; pH= 9.0.
- **Buffer DNA ligasa 10x:** 300 mM Tris-HCl; 100 mM $MgCl_2$, 100 mM DTT, 1mM ATP; pH=7.8.
- **Tampón de sonicación:** 20 mM Tris-base, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF; pH=8.0.

4.1.3. Materiales de biología molecular

4.1.3.1. Cepas bacterianas

Se utilizaron las siguientes cepas bacterianas de la conocida como *Escherichia coli* (*E. coli*):

- **BLR (DE3) Competent Cells** (*Novagen*; eficiencia (cfu/ μ g de pUC18 DNA) $\geq 10^7$) empleada para la expresión de proteínas o polímeros recombinantes. En microbiología, cfu es un término que hace referencia a unidad formadora de colonias.
- **XL1-Blue Subcloning Grade** (*Stratagene*; eficiencia (cfu/ μ g de pUC18 DNA) $\geq 10^6$) empleada para subclonación de DNA.
- **XL1-Blue Competent Grade** (*Stratagene*; eficiencia (cfu/ μ g de pUC18 DNA) $\geq 10^8$) empleada para clonación o ligación de DNA.
- **NZY5 α Competent Grade** (*Nzytech*; eficiencia (cfu/ μ g de pUC18 DNA) $\geq 10^9$) empleada para clonación o ligación de DNA.

4.1.3.2. Medios de cultivo bacteriano

Las bacterias mencionadas anteriormente necesitan de medios específicos tanto para su crecimiento como para su correcta transformación. Los que se han utilizado en este trabajo son los siguientes:

- **LB (*Lysogeny Broth*)**: se trata del medio líquido seleccionado si se pretende cultivar y hacer crecer a bacterias para diversos fines. Su composición es 10 g/L de bactotripton, 10 g/L NaCl y 5 g/L de extracto de levadura.
- **LB-agar**: se trata del medio sólido con el cual se recubren las placas de cultivo bacteriano. Se prepara mediante el medio LB mencionado anteriormente (25 g/L) y 15 g/L de bacto-agar.
- **TB (*Terrific Broth*)**: se trata del medio líquido seleccionado si se pretende aumentar la expresión de los genes y, por lo tanto, la producción de nuestro polímero recombinante tipo elastina. Su composición es 20 g/L de triptófano, 24 g/L de extracto de levadura, 4 mL/L de glicerol, 0.017 M K_2HPO_4 y 0.072 M K_2HPO_4 .
- **S.O.C. Medium**: se trata del medio líquido seleccionado para producir transformaciones bacterianas de manera satisfactoria. Su composición es 2% (m/v) de triptófano, 0.5% (m/v) de extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$ y 20 mM glucosa; pH=7.0.
- **TSS (solución de almacenamiento y transformación)**: se trata del medio líquido seleccionado cuando se pretende proceder al criomacemamiento de una determinada transformación. Se compone de medio LB suplementado con un 10% (m/v) de polietilenglicol (PEG) $M_r=335$ Da, un 0.5% (v/v) de DMSO y 50 mM de Mg^{2+} ; pH=6.5.

Todos los medios son esterilizados mediante autoclave una vez han sido preparados. Este procedimiento consiste en mantener durante 20 minutos todas las disoluciones a una temperatura de 121°C y a 1 atmósfera de presión.

4.1.4. Proteínas

4.1.4.1. Enzimas de restricción

Las enzimas de restricción o endonucleasas son proteínas que poseen actividad catalítica nucleasa. Las endonucleasas que se han empleado durante este trabajo junto con sus diferentes secuencias diana se muestran en la *Tabla 1*.

Enzima de restricción	Secuencia diana
<i>EcoRI</i>	5' GAATTC 3' 3' CTTAAG 5'
<i>EarI</i>	5' CTCTTCN NNN 3' 3' GAGAAGNNNN 5'
<i>XhoI</i>	5' CTCGAG 3' 3' GAGCTC 5'
<i>XbaI</i>	5' TCTAGA 3' 3' AGATCT 5'
<i>AanI</i>	5' TTA TTAATAA 3' 3' AATAATTATT 5'
<i>NdeI</i>	5' CATATG 3' 3' GTATAC 5'
<i>SapI</i>	5' GCTCTTCN NNN 3' 3' CGAGAAGNNNN 5'

Tabla 1. Enzimas de restricción con sus correspondientes secuencias diana.

Es preciso aclarar que todas las enzimas de restricción mencionadas se utilizaron con el fin de identificar los fragmentos de restricción que se generan (digestión analítica y diagnóstico del gen) exceptuando la endonucleasa *SapI*, que se empleó para linealizar el plásmido previamente a su clonación (digestión preparativa).

Todas las enzimas utilizadas durante el trabajo fueron empleadas siguiendo adecuadamente los protocolos de uso (*Thermo Fisher*), junto con su correspondiente tampón o *buffer*.

4.1.4.2. Otras enzimas

Se han empleado otras enzimas durante este trabajo cuya actividad no es endonucleasa. Estas son las siguientes:

- **FastAP (Thermosensitive Alkaline Phosphatase):** enzima quinasa de la familia de las esterasas cuya función es aumentar la velocidad de la reacción de hidrólisis de los grupos fosfato del DNA. Este proceso se denomina defosforilación.
- **SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase):** enzima quinasa con actividad hidrolasa que es capaz de catalizar la reacción de hidrólisis de los grupos fosfato de los nucleótidos.
- **T4 DNA Ligase:** enzima fosfatasa con actividad ligasa que es capaz de catalizar la formación de enlaces fosfodiéster entre el extremo 5' de una cadena de DNA linealizada con el extremo 3' de la misma. Esta enzima fue aislada originalmente en el bacteriófago T4, de ahí su nombre.

4.1.5. Vectores plasmídicos

Existen dos tipos de vectores plasmídicos en función de su uso en Biología molecular: vectores de clonación y vectores de expresión.

4.1.5.1. Vector de clonación

El vector de clonación que se ha utilizado durante este trabajo es **pDriveAll** (Figura 11), modificado por el Dr. A. Ribeiro²⁴ en el grupo de Materiales Avanzados y Nanobiotecnología BIOFORGE a partir del vector de clonaje pDrive de Qiagen.

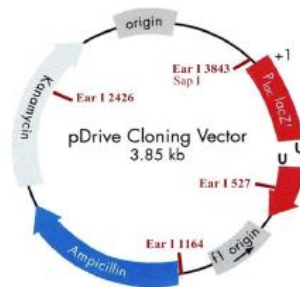


Figura 11. Representación del vector de clonación pDrive modificado. Se indica la posición de las secuencias diana de las endonucleasas EarI y SapI añadidas y su tamaño en pares de bases (pb).

4.1.5.2. Vector de expresión

El vector de expresión que se emplea durante este trabajo se denomina pET7 (Figura 12), modificado en el grupo de Materiales Avanzados y Nanobiotecnología BIOFORGE por la Dra. A. Girotti²⁵ a partir del vector pET-25b(+) de Novagen.

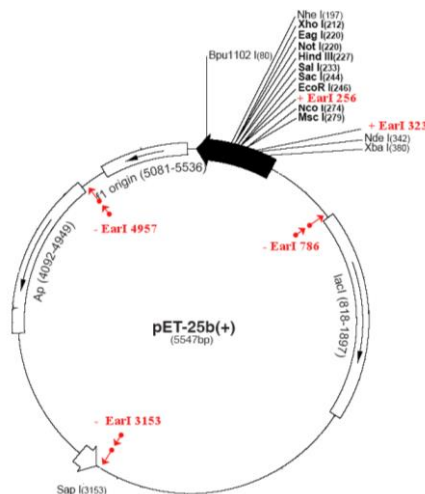


Figura 12. Representación del vector de expresión pET7 modificado a partir del pET-25b (+). Se indica la posición de las secuencias diana de la endonucleasa EarI añadidas (+ EarI) y las eliminadas (- EarI) junto con su tamaño en pares de bases (pb).

4.1.6. Plásmidos empleados para la síntesis de genes

Para la realización de este trabajo se ha necesitado la utilización de dos plásmidos. Estos plásmidos contienen fragmentos de DNA que nos interesan a la hora de construir el gen que va a codificar para nuestro polímero recombinante tipo elastina.

4.1.6.1. *pHTQ-ScFv*

En este caso, el inserto ScFv (single-chain Fragment variable) se encuentra unido al vector de clonación *pHTQ*. El inserto proteico ScFv contiene 4 cisteínas (C) (marcadas en azul en la secuencia de aminoácidos siguiente) que son capaces de formar puentes disulfuro entre ellas, dando lugar a la conformación nativa y activa de dicha proteína. Esta proteína posee actividad de anticuerpo, uniéndose de manera específica al antígeno VEGF₁₆₅ (Vascular Endothelial Growth Factor 165) que es una proteína homodimérica constituida por dos polipéptidos de 165 aminoácidos unidos por enlace disulfuro. La secuencia de aminoácidos de la proteína ScFv es la siguiente:

```
AEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAGSGFTT SSDEMHWVRQ APGKGLEWVS AAFGTDGTY Y  
ADSVKGLFTI SRDNAKNSLY LRMNSLRAED TAVYYCREKK SSSWGQGLV TVSSGGGGSG  
GGSGGSALS SELTQDPAVS VALGQTVRIT CQGDLSSYY ASWYQQTPGQ APVLKAGKYN  
NRPSGIPGRF SGSSSGNTAS LTITGAQAED EADYYCNSSS DEFFDNHVFV GGTKLTVLGA
```

El gen que codifica para esta proteína contiene 746 pares de bases (pb), mientras que el vector *pHTQ* contiene 2960 pares de bases (pb). Esto implica que el plásmido completo *pHTQ-ScFv* contendrá 3706 pb.

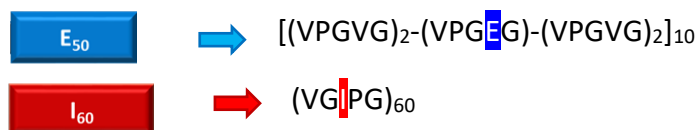
4.1.6.2. *pDA-(EI)x2*

Este plásmido está compuesto por el vector de clonación *pDriveAll* y por el inserto (EI)x2. Este inserto, y tal como se muestra en la *Figura 13*, está constituido por dos repeticiones del gen que codifica para el dibloque proteico (EI). Este dibloque, a su vez, se compone de los bloques proteicos E e I.



Figura 13. Representación esquemática del polímero recombinante tipo elastina (EI)x2.

Cada uno de estos bloques proteicos posee una secuencia de aminoácidos concreta que se expone a continuación:



El inserto (EI)x2, también conocido como tetrabloque, está constituido por 3303 pb. El vector de clonaje, sin embargo, se compone de 3937 pb. Es por esto por lo que el plásmido completo *pDA-(EI)x2* está formado por 7240 pb.

4.1.7. Kits de purificación y extracción de DNA

Para poder realizar los diversos métodos de la Biología molecular de manera adecuada es necesario trabajar con fragmentos de DNA conocidos y puros. Sólo de esta manera se obtienen las secuencias de aminoácidos que se pretenden sintetizar. Los kits que se han empleado para purificar plásmidos de DNA obtenidos a partir de los cultivos bacterianos de *E. coli* y de geles de agarosa son:

- **NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid)** (*Macherey-Nagel*): este kit se utiliza para obtener el DNA plasmídico purificado de pequeñas muestras de cultivo bacteriano (5 mL). La lisis alcalina en la que se basa la técnica se explica en el apartado 4.2.4.1.1. de este trabajo.
- **Quantum Prep Plasmid MidiPrep Kit** (*Bio-Rad*): este kit se utiliza para obtener el DNA purificado de mayores cantidades de cultivo bacteriano (40 mL) y se basan en la misma técnica, la cual se explica detalladamente en el apartado 4.2.4.1.2. de este trabajo.
- **PureLink Quick Gel Extraction Kit** (*Invitrogen, Life Technologies*): este kit se utiliza para purificar el DNA desde el gel de agarosa y su fundamento se explica en el apartado 4.2.4.2. de este trabajo.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La electroforesis es una técnica de separación que se utiliza para clasificar diversos tipos de biomoléculas cargadas.

La electroforesis convencional de DNA (*Figura 14*) en geles de agarosa es una técnica de separación que permite separar diferentes fragmentos de DNA dependiendo de su tamaño dado el carácter poroso del gel de agarosa. Los fragmentos de DNA pueden provenir de la digestión de un plásmido realizada mediante enzimas de restricción, de la purificación de un determinado gen o de la amplificación de una fracción de material genético mediante la técnica PCR (*Polimerase Chain Reaction*).

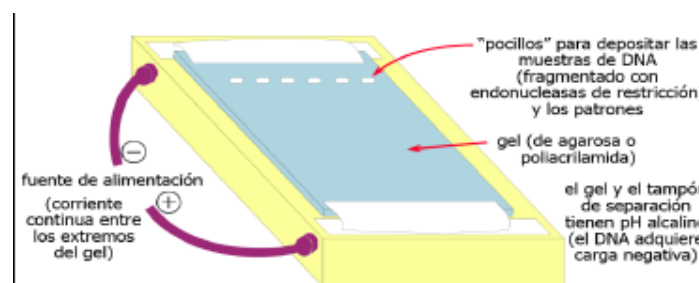


Figura 14. Representación esquemática de una electroforesis convencional de DNA.

Debido a los elevados potenciales con los que se trabaja en la electroforesis convencional, resulta preciso utilizar un medio anticonvectivo que evite tanto la pérdida de eficacia de la

separación, como el sobrecalentamiento de las muestras. Este medio anticonvectivo es generalmente una capa de gel poroso en formato de placa, en cuyos poros contiene el tampón de separación. En este trabajo, la electroforesis de DNA se ha realizado empleando geles de agarosa.

La agarosa es un polisacárido lineal, constituido por residuos alternantes de D-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactopiranosas, que se extrae de algunos tipos de algas. Este glúcido debe disolverse en caliente (entre 50 y 60°C) para que, al enfriarse, se solidifique formando un gel de una elevada porosidad. La agarosa se disuelve en un tampón de separación Buffer TAE 1x para que los poros que se forman en el gel contengan dicho tampón. Este *buffer* posee un pH de 7.5, medio acuoso en el cual los grupos fosfato del DNA se encuentran cargados negativamente. Esto provocará que dichas biomoléculas se trasladen hacia el polo positivo o ánodo una vez se aplique una diferencia de potencial elevada entre los electrodos (entre 2 y 7 V/cm). Debido a que el *buffer* mantiene el pH de la disolución constante durante todo el procedimiento de separación, la carga de todos los fragmentos de DNA será idéntica. Esto implica que la separación de las diferentes moléculas de DNA presentes en la disolución se va a realizar única y exclusivamente en función de su tamaño, por lo que el gel actúa como un tamiz molecular (*Ecuación 2*).

$$v = \mu_a \cdot E = \mu_a \cdot \frac{V}{L}$$

Ecuación 2. Velocidad de migración de las biomoléculas en la electroforesis convencional de DNA en gel de agarosa.

donde v es la velocidad de migración; μ_a es la movilidad aparente de cada especie; E es el campo eléctrico aplicado entre electrodos; V es el potencial o voltaje aplicado entre electrodos; y L es el espacio entre dichos electrodos.

La movilidad de dichas especies va a depender no sólo de su tamaño, sino también de la porosidad del medio anticonvectivo. Cuanto mayor sea el tamaño de poro, mejor se separarán los fragmentos de DNA de elevado tamaño y viceversa. Además, el tamaño de poro dependerá de la concentración de agarosa con la que se prepare el gel: a mayor concentración, mayor será la rigidez del enrejado polimérico. El rango de tamaños de DNAs que se pretendan separar en una electroforesis lo dicta la concentración de agarosa del gel (*Tabla 2*).

Rango de tamaño de los fragmentos de DNA en pares de bases (pb)	% (m/v) de agarosa SeaKem® en el gel, disuelta en Buffer TAE 1x
5000 – 60000	0.3
1000 – 20000	0.6
800 – 10000	0.7
500 – 7000	0.9
400 – 6000	1.2
200 – 3000	1.5
100 – 2000	2.0

Tabla 2. Porcentaje en agarosa del gel en función del intervalo de tamaños de los fragmentos de DNA lineales que se pretendan separar.

El gel de agarosa se ha preparado según el intervalo a separar (respetando la *Tabla 2*) disolviendo SeaKem® LE Agarosa en 30 mL de Buffer TAE 1x (tampón de separación) en un Erlenmeyer perfectamente limpio y previamente tarado. Esta mezcla heterogénea se calienta hasta los 60°C para conseguir una disolución homogénea de la agarosa en el tampón. Se reintegra el volumen de agua ultrapura evaporada. De esta manera se consigue que la concentración del gel de agarosa sea precisa y exacta. Esta mezcla caliente se vierte sobre la cubeta de formación del gel que contiene el peine para modelar los pocillos donde se introducirán las muestras. Cuando el gel se solidifica, se introducen las muestras disueltas en un tampón de carga (DNA Loading Buffer 5x) que contiene Tris-HCl, EDTA, glicerol y el compuesto azul de bromofenol. El tampón de carga tiene una doble función: visualizar el transcurso de la electroforesis y mantener el pH de la misma a 7.5.

La electroforesis terminará cuando el colorante de referencia incluido en las muestras alcance una posición concreta en el gel.

Por último, el gel se tiñe con una disolución 1:10000 (v/v) de SimplySafe™, que contiene un marcador fluorescente (fluoróforo protegido bajo patente) que es capaz de intercalarse entre las bases nitrogenadas del DNA, en Buffer TAE 1x durante unos minutos. Pasado este tiempo, las bandas de DNA fluorescentes se observan empleando un transiluminador de luz UV *Gel Doc™ EZ Imager*.

Existen dos tipos de electroforesis convencional de DNA en geles de agarosa dependiendo de su finalidad: electroforesis analítica y electroforesis preparativa.

4.2.1.1. Electroforesis analítica

Las electroforesis de DNA analíticas se realizan con el fin de comprobar el éxito de una reacción (digestión, síntesis, purificación, etc.). En éstas se identifican el tamaño y la pureza de los productos de los fragmentos de DNA de una muestra.

4.2.1.2. Electroforesis preparativa

Las electroforesis de DNA preparativas se realizan con el fin de aislar, recuperar y purificar un determinado fragmento de DNA de interés, contenido en una banda específica del gel. Esta técnica se explica detalladamente en el apartado 4.2.4.2. de este trabajo.

4.2.2. Evaluación y análisis de los fragmentos de DNA

El patrón 1 kbPlus DNA Ladder (*Invitrogen*) es una disolución que contiene 18 fragmentos individuales de DNA purificados por cromatografía y consta de una banda ancha de 1500 pb para facilitar la orientación del experimentador (*Figura 15*). La muestra de DNA patrón tiene que emplearse en cada electroforesis como patrón comparativo.

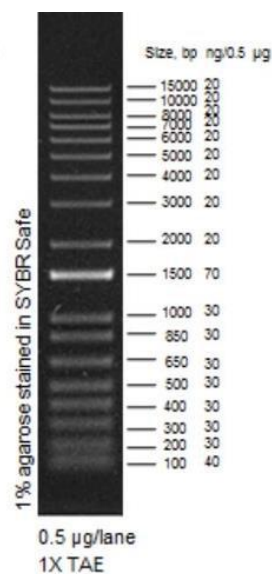


Figura 15. Bandas del marcador de referencia 1 kbPlus DNA Ladder.

De esta manera, mediante la realización de un gráfico en el que se compare tamaño y recorrido de los fragmentos de DNA del marcador (recta de calibración), se dilucidará la longitud lineal de las fracciones de DNA de nuestras muestras. Esto implica que es posible realizar la semicuantificación del DNA de doble cadena en un intervalo de entre 100 pb y 15000 pb.

4.2.3. Determinación y análisis de la concentración y pureza de las muestras de DNA

La concentración de una disolución de DNA purificado se ha determinado realizando un análisis de la absorbancia mediante un espectrofotómetro de micromuestra NanoDrop 2000 (*Thermo Scientific*). La absorbancia y la concentración pueden relacionarse mediante la *Ecuación 3*.

$$A = a \cdot b \cdot c$$

Ecuación 3. Absorbancia en función de la concentración de DNA de la disolución

donde **A** es la absorbancia a una determinada longitud de onda (λ); **a** es la absortividad a dicha λ ; **b** es el camino óptico que sigue la radiación cuando pasa a través de la muestra; y **c** es la concentración de la biomolécula que absorbe dicha radiación.

Se emplea un espectrofotómetro de UV-Visible de espectro completo, por lo que la radiación es emitida por una lámpara de Deuterio (zona UV) y una lámpara de Wolframio (zona Visible). Con el fin de excitar la muestra con una longitud de onda determinada es necesario aislar de modo preciso la radiación electromagnética mediante un sistema monocromador. Éste consta de una rendija de entrada, de un sistema dispersante (red de difracción) y de una rendija de salida.

Este espectrofotómetro es capaz de evaluar la relación de absorbancias a dos longitudes de onda diferentes (relación A260/A280 y relación A260/A230) lo que permite determinar la pureza del DNA (*Tabla 3*). La relación A260/A280 es muy estable por lo que su uso resulta útil para este fin. Los contaminantes habituales de las muestras genéticas suelen absorber a 230 nm.

Relación	Valor (adim.)	Pureza
A260/A280	>2.0	Contaminación con RNA
	1.8 – 2.0	DNA de pureza óptima
	1.6 – 1.8	DNA de pureza aceptable
	< 1.6	Presencia de compuestos aromáticos
A260/A230	1.5 – 2.2	DNA de pureza óptima
	< 1.5	Contaminación con sales, carbohidratos y fenoles

Tabla 3. Valores indicativos de la pureza en muestras de DNA.

Esta técnica instrumental permite cuantificar y evaluar la pureza de muestras con un volumen desde 0.5 μ L. El blanco que se utiliza en cada determinación es el *buffer* de elución con el que se haya realizado la purificación del DNA contenido en la muestra. Esto provoca que el detector es capaz de disminuir el ruido de fondo, disminuyendo a su vez el límite de cuantificación (LOQ). La medida de la absorbancia no es un método absoluto de análisis, por lo que es necesaria la realización de un calibrado lineal para conocer el valor de la absortividad.

4.2.4. Purificación de plásmidos

Para que las transformaciones bacterianas y las clonaciones ocurran de manera controlada y satisfactoria es necesario que las muestras de DNA que se utilizan estén compuestas por un único fragmento de DNA de secuencia conocida. Existen dos modalidades de purificación de DNA. Su diferencia radica en el lugar del que se extrae el DNA: de una cepa bacteriana o de un gel de agarosa.

4.2.4.1. Purificación de DNA plasmídico de cepas bacterianas (*E. coli*)

En este caso se pretende extraer y purificar el DNA plasmídico contenido en el citoplasma bacteriano. Para ello, existen dos kits que se mencionaron en el apartado 4.1.7. de este trabajo. Estos son el *NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid)* y el *Quantum Prep® Plasmid MidiPrep Kit*. Cada uno de estos kits contiene un protocolo de uso proporcionado por el fabricante que se detalla en los siguientes apartados, y que se representa esquemáticamente en la *Figura 16*.

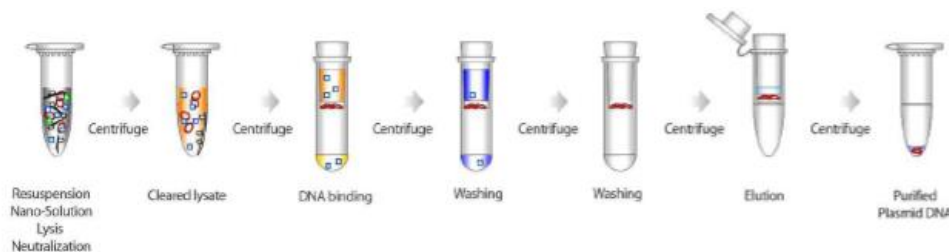


Figura 16. Representación del proceso de purificación de DNA plasmídico de cepas bacterianas *E. coli*. Etapa I: lisis alcalina y neutralización. Etapa II: clarificación del lisado. Etapa III: extracción en fase sólida. Etapa IV: eliminación de interferentes apolares. Etapa V: eliminación de interferentes polares. Etapa VI: elución del DNA.

4.2.4.1.1. Protocolo NucleoSpin® Plasmid/Plasmid NoLid

En primer lugar, se centrifuga el cultivo bacteriano en medio líquido (5 mL) para separar las bacterias clonadas del medio bacteriano en el cual han estado replicándose. Tras este proceso físico, se elimina el sobrenadante con sumo cuidado y se resuspenden dichas células en agua MilliQ®. A continuación, esta disolución turbia debe volver a someterse a centrifugación. El sobrenadante se elimina y se resuspenden las bacterias en el **Buffer A1** almacenado a 4°C. Este procedimiento permite eliminar por completo el medio bacteriano en el que se han reproducido las células para comenzar con el proceso de purificación. Este tampón contiene la enzima RNAasa, que es capaz de degradar el RNA que pueda haber en disolución. Este paso es muy importante puesto que, si existiese RNA en la disolución, éste sería purificado junto con el DNA recombinante. Cuando se midiese la pureza de la disolución de DNA impurificada con RNA, la relación A260/A280 tendría un valor superior a 2.0 (*Tabla 3*). A continuación, se añade el **Buffer A2**. Este tampón contiene NaOH y un detergente fuertemente aniónico (SDS). Esta alcalinización provoca la ruptura parcial de la pared celular y de la membrana plasmática de las bacterias huéspedes, por lo que se consigue la liberación del DNA plasmídico al medio

extracelular (lisis alcalina). En estas condiciones se provoca la sedimentación de los residuos celulares y de las macromoléculas, los plásmidos se mantienen en disolución acuosa y se produce la desnaturalización del DNA bacteriano y de las proteínas de la célula procariota. La razón por la que los plásmidos quedan inalterados es su pequeño tamaño, lo que les confiere una gran estabilidad frente a los agentes químicos. Por último, se añade el **Buffer A3**. Esta disolución actúa como tampón de neutralización para contrarrestar el efecto del Buffer A2. Además, el Buffer A3 contiene cloruro de guanidinio cuya función es la de romper los posibles enlaces no covalentes que se hayan formado entre DNA y otras biomoléculas presentes en la disolución. De este modo, el DNA plasmídico queda completamente libre en el medio extracelular tras la ruptura de las bacterias que lo contenían (*Etapa I-Figura 16*). Tras estos pasos se observa una turbidez considerable en los eppendorf debido a que los restos celulares (proteínas y ácidos grasos de la membrana plasmática) se encuentran en suspensión. Con el fin de separar dichos restos celulares de la disolución de DNA plasmídico se realiza a continuación una centrifugación (*Etapa II-Figura 16*). Este procedimiento provocará que los restos de las células se separen de la disolución de DNA físicamente, quedando como precipitado (pellet) y sobrenadante respectivamente.

La disolución de DNA obtenida tras la centrifugación se hace pasar a través de una minicolumna de extracción en fase sólida (SPE) (*Etapa III-Figura 16*). El sorbente de dicha minicolumna (sílica) tiene una elevada afinidad por el DNA y muy poca por otras biomoléculas presentes en la disolución (proteínas de bajo peso molecular). Estas biomoléculas son interferentes en la extracción en fase sólida (SPE) puesto que se pretende obtener una disolución purificada de DNA plasmídico. Para eliminar dichos interferentes se añade un **Buffer de lavado AW** precalentado a 50°C que tiene mucha afinidad por los interferentes de la extracción y poca por el DNA (*Etapa IV-Figura 16*). Esto provoca que los interferentes, que hayan podido quedar adsorbidos físicamente en la columna, eluyan en el Buffer AW. Gracias a que en este paso se eliminan posibles contaminaciones de la disolución de DNA, la precisión de las reacciones enzimáticas que se llevan a cabo posteriormente con endonucleasas (*apartado 4.1.4.1.*) aumenta. A continuación, se añade el **Buffer de lavado A4**. Este tampón consigue eliminar los interferentes polares que hayan podido quedar retenidos en la sílica, puesto que contiene etanol. Este etanol puede quedar embebido en el sorbente e inhibir las reacciones enzimáticas que se realicen posteriormente sobre el DNA plasmídico, por lo que se elimina centrifugando la minicolumna (*Etapa V-Figura 16*).

Exclusivamente el DNA plasmídico está retenido en el sorbente de la minicolumna. En este momento se debe realizar la elución del mismo con una disolución adecuada: **Buffer AE** (5 M Tris-HCl, pH 8.5) precalentado a 70°C (*Etapa VI-Figura 16*). Este tampón tiene más afinidad por el DNA que la sílica, por lo que es capaz de eluirlo. En este momento, para conseguir recuperar todo el DNA es más efectivo realizar dos eluciones con un menor volumen que una sola elución con un volumen superior de Buffer AE. Esta premisa se puede demostrar con la *Ecuación 4*.

$$C_n = C_1 \cdot \left(\frac{V_1}{V_1 + V_n \cdot P_{DNA}} \right)^{n-1}$$

Ecuación 4. Concentración de DNA en extracción múltiple por etapas.

donde C_n es la concentración de DNA en la disolución cuando se han realizado n extracciones; C_1 es la concentración de DNA en la disolución cuando se ha realizado una extracción; V_1 es el volumen utilizado para eluir en la primera extracción; V_n es el volumen utilizado para eluir en la n extracción; P_{DNA} es el coeficiente de reparto del DNA en el eluyente; y n es el número de extracciones realizadas.

Finalmente, una vez se obtiene el DNA plasmídico purificado en disolución, se determina su concentración mediante un espectrofotómetro de micromuestra NanoDrop 2000 (*apartado 4.2.3.*).

4.2.4.1.2. Protocolo Quantum Prep® Plasmid MidiPrep Kit

Los primeros pasos de este protocolo, previos al proceso de purificación, son idénticos a los procedimientos seguidos en el apartado anterior. Sin embargo, existen dos diferencias entre ambos. La primera es la cantidad de cultivo bacteriano que se emplea para extraer el DNA plasmídico (50 mL en este kit frente a los 5 mL del anterior). La segunda diferencia es que, en este protocolo tras la lisis alcalina (*Etapa I-Figura 16*) se añade una resuspensión del sobrenate o matriz sobre la fase líquida. Debido a la diferencia de densidad entre el sobrenadante y el complejo matriz-DNA, se separarán ambas físicamente mediante centrifugación.

Finalmente, una vez se obtiene el DNA plasmídico purificado en disolución se determina su concentración mediante un espectrofotómetro de micromuestra NanoDrop 2000 (*apartado 4.2.3.*).

4.2.4.2. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa. Protocolo PureLink™ Quick Gel Extraction Kit.

La purificación de fragmentos de DNA o separación de éstos se lleva a cabo en una electroforesis convencional en gel de agarosa. Tras la tinción del gel, la banda se visualiza haciendo incidir luz ultravioleta sobre el gel, se aísla cortándola y se purifica. Se utiliza tras ello el kit PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, Life Technologies). La zona de gel que contiene el fragmento de DNA que nos interesa se disuelve y el fragmento de DNA se aísla de la disolución mediante extracción en fase sólida (SPE) tal y como muestra la *Figura 17*. De este modo, se consigue obtener dicho DNA purificado en disolución acuosa.

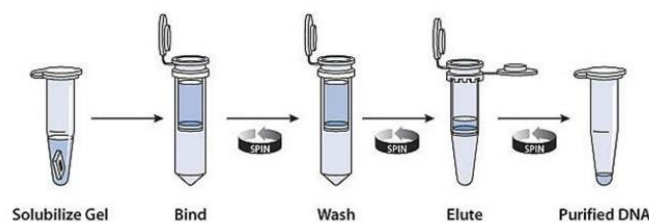


Figura 17. Representación del proceso de extracción y purificación de DNA plasmídico a partir de geles de agarosa. Etapa I: extracción en fase sólida. Etapa II: eliminación de interferentes apolares y polares. Etapa III: elución del DNA.

Tal y como ocurría en los dos protocolos anteriores, el sorbente tiene mucha afinidad por el DNA y muy poca por el resto de las biomoléculas (*Etapa I-Figura 17*). Esto nos permite eliminar los posibles interferentes que pueda haber en la disolución. Para eliminarlos por completo se debe hacer pasar a través de la minicolumna de extracción el **Buffer de lavado W1** con etanol, tras lo cual se realiza una centrifugación (*Etapa II-Figura 17*). Este tampón de lavado es capaz de eluir tanto las impurezas polares como las apolares. De nuevo, es importante eliminar por completo los restos de etanol que hayan podido quedar embebidos en la sílica por lo que se debe llevar a cabo una centrifugación a dichas minicolumnas en seco. Por último, se añade el **Buffer de elución E5** para conseguir el DNA plasmídico purificado en disolución acuosa y se realiza una centrifugación (*Etapa III-Figura 17*).

Finalmente, una vez se obtiene el DNA plasmídico purificado en disolución, se determina su concentración mediante un espectrofotómetro de micromuestra NanoDrop 2000 (*apartado 4.2.3.*).

Es preciso tener en cuenta que este kit de extracción está ideado para purificar fragmentos de DNA linealizado, por lo que no debe utilizarse para purificar DNA plasmídico superenrollado o DNA genómico.

4.2.5. Digestión de DNA mediante enzimas de restricción

El proceso en el cual una enzima endonucleasa corta al DNA en sus correspondientes secuencias diana se denomina digestión del DNA. La fragmentación del material genético con el que se trabaja se realiza sobre unas secuencias diana específicas y de tamaño variable (entre 6 y 11 nucleótidos). Estos sitios de reconocimiento suelen poseer una secuencia palindrómica.

La digestión enzimática debe llevarse a cabo en unas condiciones muy específicas y de manera controlada para que el proceso sea satisfactorio (temperatura, concentración, tiempo de reacción, tampón de reacción y pH del medio). Con el fin de comprobar si la reacción de digestión ha ocurrido adecuadamente, se realiza una electroforesis de agarosa analítica (*apartado 4.2.1.1.*).

Se distinguen dos tipos de digestiones: digestión analítica y digestión preparativa. La digestión analítica se lleva a cabo con el fin de comprobar si la reacción de interés ha ocurrido satisfactoriamente y la digestión preparativa se emplea para purificar un determinado fragmento y realizar con él una clonación posterior.

Las enzimas de restricción que se han utilizado en este trabajo en función del tipo de digestión realizada se resumen en la siguiente tabla (*Tabla 4*).

Tipo de digestión	Enzimas de restricción
Analítica	<i>EcoRI, EarI, XhoI, XbaI, AatI, NdeI.</i>
Preparativa	<i>SapI, EarI.</i>

Tabla 4. Enzimas de restricción empleadas en función de la digestión realizada.

Para realizar una digestión analítica se necesita mezclar 200-1000 ng del plásmido que se pretende digerir, con el 10% de tampón *Green Buffer Fast Digest 10x* (v/v) con respecto al volumen final de la digestión, junto con la enzima añadida a la concentración indicada por la casa comercial y agua MilliQ® hasta llegar al volumen final de la digestión. Ésta se incuba durante 30 minutos en la incubadora estática (*Memmert*), la cual tiene una temperatura constante de 37°C.

En cambio, para realizar una digestión preparativa se necesita mezclar una cantidad superior a la anterior del plásmido que se pretende digerir, *Tango Buffer 10x* en volumen tal que sea el 10% (v/v) del volumen final de la digestión, la enzima en la concentración indicada por la casa comercial y agua MilliQ® hasta llegar al volumen final de la digestión. Ésta se incuba durante 14 horas en la incubadora estática, la cual se encuentra a una temperatura constante de 37°C.

4.2.6. Tratamiento de DNA con enzimas de defosforilación

Cuando se linealiza un plásmido con la enzima *SapI* para poder realizar una clonación, se debe hidrolizar el grupo fosfato que queda libre en el extremo 5' de la doble cadena de DNA. Esta defosforilación impide que el DNA vuelva a ciclarse de manera espontánea. Las enzimas que se utilizan para defosforilar el DNA son FastAP y SAP, las cuales deben emplearse en las condiciones de activación e inactivación que marca la casa comercial que las suministra (tampón, temperatura y tiempo).

La reacción de defosforilación se realiza dos veces. La primera defosforilación se realiza utilizando la enzima quinasa FastAP, la cual se activa manteniendo la temperatura a 37°C durante 15 minutos y se desactiva a 65°C durante 5 minutos. La segunda defosforilación se lleva a cabo empleando la quinasa SAP, enzima que se activa manteniendo la temperatura a 37°C durante 1 hora y se desactiva a 80°C durante 15 minutos.

4.2.7. Reacción de ligación

La reacción de ligación consiste en la unión de un inserto (fragmento de DNA que codifica para nuestra proteína recombinante tipo elastina) a un vector plasmídico. Esta reacción de ligación es catalizada mediante la T4 DNA ligasa, la cual se emplea con el tampón que suministra la casa comercial (*Buffer 10x T4 ligasa*). Esta enzima se activa manteniendo la temperatura a 22°C durante 1 hora y no precisa de inactivación posterior.

Es importante que las enzimas de restricción sean capaces de generar extremos compatibles entre el vector y el inserto antes de realizar la reacción de ligación. Esto significa que dichas enzimas tienen que dar lugar a extremos cuyos 'salientes' tengan secuencias complementarias y, por lo tanto, puedan anclarse entre sí tal y como se muestra en la *Figura 18*.



Figura 18. Representación de extremos compatibles de una secuencia de nucleótidos generados por enzimas de restricción.

4.2.8. Preparación de placas de cultivo bacteriano.

Para preparar placas de Petri LB-Agar para su uso como placas de cultivo bacteriano se realiza una disolución de LB (*Lysogeny Broth*) en agua ultrapura a una concentración 25 g/L. Para su completa disolución y para su esterilización se somete a una temperatura de 120°C durante 20 minutos en un autoclave. Tras atemperar el medio, se añade una concentración adecuada del antibiótico correspondiente y se reparte en las placas de cultivo bacteriano. Este medio solidificará enfriándose y podrá emplearse para la siembra de bacterias y para el cultivo de colonias aisladas.

4.2.9. Transformación de cepas bacterianas

El DNA recombinante (rDNA) que se ha clonado con un vector concreto debe introducirse en la célula anfitriona, en nuestro caso una bacteria (célula procariota), para que se generen copias exactas del plásmido completo. Esta célula es la encargada de replicar el material genético exógeno, que se ha introducido en ella, de manera independiente a la replicación de su propio material genético. Este proceso se denomina transformación bacteriana. Las bacterias huésped, diferentes cepas de la bacteria *E. coli*, se someten a varios tratamientos fisicoquímicos para que sean susceptibles de incorporar DNA exógeno en su interior (células competentes). En este trabajo se han realizado varias transformaciones en función de la eficiencia transformante necesaria (*apartado 4.1.3.1.*), cada una de ellas con un protocolo de uso similar. Todos los protocolos prevén una incubación a 4°C de las células competentes con la disolución de DNA de interés durante la cual coprecipitan células y DNA. A continuación, se realiza un shock térmico a 42°C durante 30 segundos para favorecer la permeabilización de la membrana celular de las bacterias frente al material genético exógeno junto al que se encuentran en disolución, y se incuban durante 2 minutos a 4°C.

Seguidamente, se añade un volumen de medio enriquecido S.O.C. precalentado a 37°C en la incubadora estática con el fin de maximizar la eficiencia de la transformación bacteriana. Esta mezcla homogénea se incuba con agitación constante a 250 rpm durante 30 minutos a 37°C

en la incubadora dinámica (*Selecta*). Debe existir un intercambio de aire permanente entre el interior y el exterior del tubo de transformación para favorecer una buena oxigenación de las células transformantes. Transcurridos los 30 minutos, se siembra un volumen entre 20 μL y 40 μL de la mezcla de transformación en placas de cultivo bacteriano LB-Agar que contengan el antibiótico al cual el vector plasmídico incorporado confiere resistencia (Ampicilina y Kanamicina en este trabajo). Estas placas se almacenan en la incubadora estática durante 16 horas a 37°C empaquetadas en papel de aluminio para limitar la evaporación y boca abajo. Finalmente, se seleccionan las colonias bacterianas que han crecido y que se encuentran aisladas, se realiza una resiembra en medio líquido LB-Antibiótico y se cultiva durante 16 horas en la incubadora dinámica a 37°C y 250 rpm. Para comprobar que las células huéspedes han sido transformadas con el DNA exógeno correcto, se realiza una electroforesis analítica de DNA en gel de agarosa (*apartado 4.2.1.1.*).

A continuación, se explican los diferentes métodos de transformación que se han realizado en este trabajo. Los protocolos seguidos en cada uno de ellos son similares, con variaciones en los volúmenes de cada material empleado y en los tiempos de incubación.

4.2.9.1. Transformación con BLR (DE3) Competent Cells

Para esta transformación se emplean 250 μL de células competentes BLR (DE3) que serán capaces de transformar hasta 3 μL de la solución que contiene el plásmido. Ambos componentes se incuban en agua-hielo (4°C) y se realiza un shock térmico a 42°C durante 30 minutos para que las células puedan incorporar en su interior el plásmido exógeno. Se añaden a continuación 250 μL de S.O.C. médium (*apartado 4.1.3.2.*). La mezcla homogénea se incuba con agitación constante a 250 rpm durante 30 minutos a 37°C en la incubadora dinámica y se siguen los pasos explicados en el *apartado 4.2.9.*

Esta transformación se emplea para la bioproducción de polímeros recombinantes tipo elastina (ELR), lo cual se detalla en el *apartado 4.2.11.* de este trabajo.

4.2.9.2. Transformación con XL1-Blue Subcloning Grade Cells

Estas células procariotas son tratadas con CaCl_2 a 0°C durante su incubación y son sometidas a una elevación de la temperatura brusca hasta los 42°C.

Para esta transformación se emplean 10 μL de células con grado de subclonación XL1-Blue que serán capaces de transformar hasta 0.5 μL de la solución que contiene el plásmido. Se incuba la mezcla en agua-hielo (4°C) durante 20 minutos para permeabilizar la membrana de las bacterias. A continuación, se realiza un shock térmico durante 30 segundos y se añade el volumen de S.O.C. que corresponda, realizando los pasos explicados en el *apartado 4.2.9.*

4.2.9.3. Transformación con XL1-Blue Competent Grade Cells

Para esta transformación se emplean 40 μL de células competentes XL1-Blue que serán capaces de transformar hasta 4 μL de la solución que contiene el plásmido. Tras la incubación a 4°C y el shock térmico a 42°C, se añaden 360 μL de S.O.C. médium y se incuba con agitación

a 250 rpm durante 1 hora a 37°C. Por último, se llevan a cabo los pasos descritos en el *apartado 4.2.9.*

4.2.9.4. Transformación con NZY5α Competent Grade Cells

Para esta transformación se emplean 50 µL de células competentes NZY5α que serán capaces de transformar hasta 10 µL de la solución que contiene el plásmido. Se incuba la mezcla en agua-hielo durante 30 minutos, se realiza un shock térmico a 42°C durante 40 segundos y se añaden 450 µL de S.O.C. médium. Las siguientes etapas del proceso están descritas en el *apartado 4.2.9.*

4.2.10. Secuenciación del DNA

La secuenciación del DNA es la técnica mediante la cual se permite el conocimiento del orden exacto de los nucleótidos que lo conforman, así como de sus bases nitrogenadas A (adenina), T (timina), C (citosina) y G (guanina). Este orden lineal es el encargado de proporcionar un flujo de la información génica a todas las células y a su descendencia.

Esta secuenciación se lleva a cabo mediante el método Sanger, consistente en la generación de distintos segmentos de DNA empleando un DNA molde. Estos segmentos copia generados tendrán un mismo origen de replicación, pero diferente longitud. La longitud de cada copia (separadas por electroforesis capilar) dependerá de la cantidad de nucleótidos de un tipo concreto que tenga la cadena de DNA molde, por lo que se podrá determinar la secuencia de ellos en un gen determinado.

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

4.2.11. Bioproducción de polímeros recombinantes

Para conseguir producir un polímero recombinante tipo elastina se realiza primeramente una transformación bacteriana del DNA, codificante para la proteína recombinante en cuestión, insertado en un vector de expresión (*apartado 4.1.5.2.*). Las bacterias más comunes para la realización de estas transformaciones son las cepas competentes BLR (DE3) de *E. coli.* (*apartado 4.2.9.1.*).

Con el fin de comprobar si las células huéspedes han sido transformadas con el DNA exógeno correcto, se realiza una electroforesis de las proteínas totales expresadas por cada colonia en gel de acrilamida (*apartado 4.2.14.*). De este modo se puede seleccionar la colonia bacteriana que exprese el polímero recombinante en mayor cantidad y calidad. Esta colonia se nombrará como la más productora.

Para la bioproducción del ELR se lleva a cabo la preparación de cultivos consecutivos, tal y como se muestra en la *Tabla 5*.




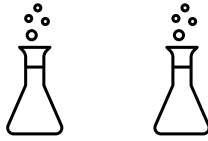

				
Colonias	Cultivo bacteriano en medio líquido	Subcultivo	Inóculo	Fermentador
	<ul style="list-style-type: none"> · Colonia más productora. · 5 mL LB con Ampicilina y glucosa. 	<ul style="list-style-type: none"> · 100 μL de cultivo bacteriano en medio líquido. · 30 mL LB con Ampicilina y glucosa. 	<ul style="list-style-type: none"> · 15 mL de subcultivo. · 500 mL LB con Ampicilina y glucosa. <p>(En cada matraz)</p>	<ul style="list-style-type: none"> · 1 L de inóculo. · 14 L TB/LB con antiespumante y Ampicilina.

Tabla 5. *Composición de los inóculos consecutivos en la bioproducción de ELRs.*

Se inicia cultivando la colonia más productora en 5 mL de medio LB con 5 μ L de Ampicilina y 250 μ L de glucosa al 20% (m/v) (*Columna 2-Tabla 5*) para inhibir la expresión de los genes durante el crecimiento de la biomasa en un tubo estéril de 50 mL, pues la glucosa actúa como represor de la traducción en *E. coli*. A continuación, se prepara un subcultivo (*Columna 3-Tabla 5*) transfiriendo 100 μ L del cultivo bacteriano en medio líquido a 30 mL de LB con Ampicilina y glucosa al 20% (m/v) (medio fresco) en un Erlenmeyer estéril de 250 mL. El subcultivo se cultiva en la incubadora dinámica durante 16 horas a 37°C orbitando a 250 rpm. Mediante la adición de nuevo medio de crecimiento se pretende favorecer el cultivo de las bacterias que se inoculan. Para realizar el inóculo (*Columna 4-Tabla 5*), se diluyen 15 mL del subcultivo en 500 mL de medio LB, 500 μ L de Ampicilina y 25 mL de glucosa al 20% (m/v) en dos matraces de 1 L cada uno. Éste se incuba durante 150 minutos en la incubadora dinámica a 37°C y a 250 rpm.

Para llevar a cabo la bioproducción a gran escala del polímero recombinante tipo elastina se precisa la utilización de un fermentador (*Columna 5-Tabla 5*). Ya que se pretende realizar una producción de 15 L, se preparan 14 L de medio TB/LB añadiéndole también antiespumante, necesario para el correcto desarrollo del cultivo, y se esteriliza junto con el fermentador. A continuación, se añaden 7.5 mL de Ampicilina y se conecta el fermentador según el protocolo “puesta en marcha del fermentador”. Las condiciones del medio en el que se cultivan las bacterias están controladas por el fermentador, por lo que se estipulan unos parámetros concretos de pH, temperatura, flujo de aire, agitación, presión y grado de saturación de

oxígeno. Por último, se introduce 1 L de inóculo para completar los 15 L de la bioproducción y se cultiva en el fermentador durante al menos 16 horas.

Transcurrido este tiempo, para poder realizar un control exhaustivo de la etapa de crecimiento en la que se encuentra la biomasa, se toman dos muestras recolectadas del fermentador en períodos de 30 minutos. Se realiza una dilución 1:20 de dichas muestras en agua ultrapura y se mide su absorbancia. Esta absorbancia se compara con la absorbancia de la dilución 1:10 del inóculo, que ha crecido en paralelo a la fermentación, y del control para conocer el crecimiento real muestral. Estas muestras y sus diluciones se esquematizan en la *Tabla 6*.





Representación				
Muestra	Fermentador 8:00 h	Fermentador 8:30 h	Inóculo	Control
Dilución	1:20	1:20	1:10	1:10

Tabla 6. Muestras y diluciones para la evaluación de la etapa de crecimiento bacteriana en el fermentador.

Si el crecimiento celular se encuentra en la etapa estacionaria, las absorbancias de las muestras 'fermentador 8:00 h' y 'fermentador 8:30 h' serán prácticamente constantes. En ese momento se para el fermentador y se recolecta la biomasa.

Es preciso realizar el lavado de las células y la ruptura de las mismas para la extracción del polímero y su purificación.

4.2.12. Aislamiento de polímeros recombinantes

Las bacterias transformadas del fermentador se recogen en recipientes de 2 L y se centrifugan a 4200 rpm durante 30 minutos a 4°C, tras lo cual se elimina el sobrenadante. A continuación, se lava el cultivo celular, para lo que se añaden 100 mL de Buffer de lavado (Tris-base 20mM, NaCl 140mM, pH=8) a cada uno de los recipientes, se resuspende el pellet celular y se somete a una centrifugación a 4200 rpm durante 15 minutos a 4°C. El procedimiento de lavado se realiza tres veces para conseguir que las células queden libres de medio de crecimiento bacteriano.

Tras los lavados, las bacterias se resuspenden con 196 mL de Buffer de lisis (Tris-base 20mM, EDTA 1mM, pH 8), que contiene el inhibidor de proteasas PMSF 1mM. La utilización de PMSF durante el proceso de lisis celular evitará la proteólisis (degradación proteica) del polímero recombinante por parte de las proteasas celulares. Se somete a las bacterias a sonicación, que consiste en ciclos de altas presiones (entre 1500 y 1800 bar.) y bajas temperaturas (4°C) con el fin de realizar la ruptura completa de sus membranas plasmáticas, permitiendo así la

liberación del polímero al medio líquido. Este proceso se repite en tres ocasiones para asegurar la ruptura completa de las mismas.

El lisado bruto bacteriano que se obtiene tras la sonicación celular se introduce en dos recipientes y se somete a una centrifugación a 14000 rpm durante 90 minutos y a 4°C. El polímero debería estar en el sobrenadante y los restos celulares en el pellet (*Figura 19*). Con el sobrenadante que contiene el polímero, se lleva a cabo la etapa de purificación para eliminar otras proteínas no recombinantes que pueden estar presentes junto con la proteína de interés.

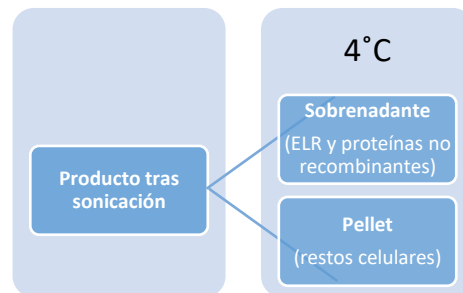


Figura 19. Representación esquemática del aislamiento del ELR.

4.2.13. Purificación de polímeros recombinantes

Para llevar a cabo la purificación del polímero se deben estudiar detenidamente sus propiedades quimiofísicas. La técnica que se utiliza para esta finalidad se denomina ciclo de transición inversa (ITC) debido a que se tiene en cuenta la temperatura de transición del polímero recombinante.

En este caso se emplea el protocolo de purificación EI_2RGD_2 ya que es el que mejor se adapta a las características del polímero.

Debido a que el recombinámero que se ha sintetizado posee un número elevado de ácidos glutámicos (E) en su secuencia de aminoácidos, el ScFv-(EI)x2 tiene tendencia a desnaturalizarse cuando es sometido a cambios bruscos de pH. Este hecho descarta como posibles protocolos de purificación aquellos en los que se realizan varios ciclos de aumento y de disminución del pH.

El protocolo EI_2RGD_2 precisa de varias etapas de calentamiento (precipitación del ELR), centrifugación y enfriamiento (solubilización del ELR), que resultan ser condiciones más suaves para la purificación del ScFv-(EI)x2. Este protocolo se esquematiza en la *Figura 20*.

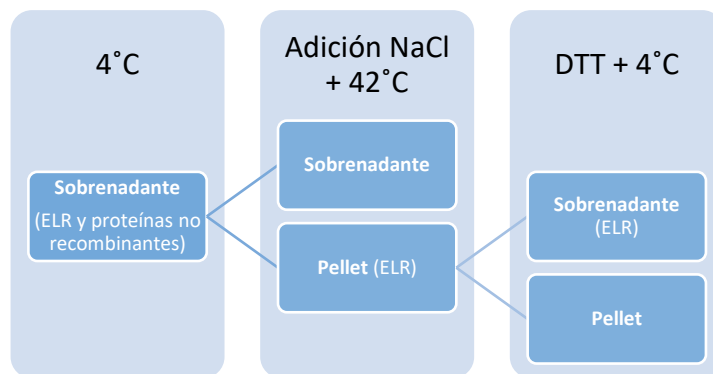


Figura 20. Representación esquemática teórica de la purificación del ELR. Etapa I: calentamiento y precipitación del ELR. Etapa II: enfriamiento y solubilización del ELR.

Este protocolo comienza con la adición de NaCl hasta conseguir una disolución de concentración 1M y el calentamiento a 42°C del sobrenadante que contiene, junto con otras proteínas, el polímero de interés (*Etapa I-Figura 20*). Una elevada concentración salina en la disolución provoca una disminución en la temperatura de transición del polímero, por lo que al elevar la temperatura se consigue la precipitación del mismo. El resto de las proteínas de la disolución no poseen temperatura de transición por lo que se mantienen en el sobrenadante. Ambos componentes proteicos se separan mediante centrifugación. Se elimina el sobrenadante y el precipitado es resuspendido en una disolución 1mM de ditioneitol (DTT). Este reductor es capaz de romper los puentes disulfuro intra e intercatenarios que se forman entre las cisteínas del polímero o del polímero con otras proteínas bacterianas, por lo que el protocolo proporciona el polímero purificado y reducido. Para conseguir la disolución completa del ditioneitol se mantiene ésta a 4°C con agitación constante durante 16 horas. Tras ello, se realiza una centrifugación de la disolución a 10000 rpm durante 15 minutos a 4°C para separar el polímero que se encuentra en el sobrenadante, del resto de proteínas que se localizan en el pellet (*Etapa II-Figura 20*).

El sobrenadante es sometido a dos nuevos ciclos de calentamiento-enfriamiento para conseguir eliminar todos los contaminantes.

Es preciso llevar un control de todos los pasos de purificación, a través de la toma de diferentes muestras y mediante la realización de electroforesis de proteínas. Este procedimiento nos permitirá identificar en qué fracción de muestra (sobrenadante o pellet) se encuentra el polímero de interés y su grado de pureza con respecto a otras proteínas.

El sobrenadante obtenido tras las etapas de purificación se somete a diálisis reductora con disoluciones de 25 L de DTT y sales de guanidina en agua destilada y ultrapura (4°C) para obtener la conformación activa de la proteína recombinante.

Finalmente, la disolución se liofiliza (congelación rápida y eliminación del hielo mediante calentamiento al vacío) para obtener el polímero purificado y seco, tras lo cual se caracteriza tanto física como químicamente.

4.2.14. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

La separación de diferentes proteínas se realiza en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE).

Resulta conveniente que la relación masa/carga de las proteínas que se van a separar mediante electroforesis sea constante. Para lograrlo, se adiciona dodecilsulfato sódico (detergente aniónico) y cada una de sus moléculas se une a dos aminoácidos. Así, las moléculas que contengan el mismo número de aminoácidos se desplazarán a través del medio anticonvectivo a la misma velocidad de migración. El SDS y el β -mercaptoetanol actúan conjuntamente como desnaturalizantes proteicos dando lugar a proteínas lineales que se moverán a través del gel poroso únicamente en función de su masa molecular.

El gel de poliacrilamida se compone de dos zonas: gel concentrador y gel separador.

El gel concentrador se prepara mezclando agua ultrapura, Tris 0.5M (pH=6.8), acrilamida al 40% (m/v), SDS al 10% (m/v), persulfato de sodio al 10% (m/v) y TEMED o TMEDA. El persulfato de sodio y el TEMED reaccionan para actuar como una especie radicalaria (*Figura 21*). Este iniciador reacciona con la acrilamida formando cadenas de poliacrilamida entrecruzadas con bisacrilamida. Esto da lugar a una mayor rigidez en el enrejado polimérico del gel. El gel separador se prepara con los mismos reactivos que el gel concentrador, exceptuando la concentración y el pH del Tris (1.5M; pH=8.8). Las cantidades que se añaden a cada uno de ellos dependen del porcentaje de acrilamida del gel y del intervalo de masas moleculares de las proteínas que se pretendan separar.

En la zona del gel concentrador, las proteínas se compactan en una banda estrecha y todas toman la misma velocidad de migración debido al bajo porcentaje de acrilamida en el gel (4%) y el menor pH; mientras que en la zona del gel separador, las proteínas se separan en función de su masa molecular debido al elevado porcentaje de acrilamida del gel (8-15%).

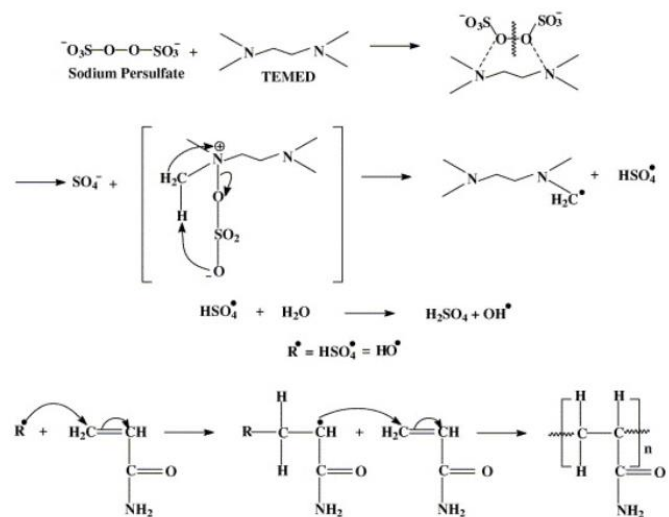


Figura 21. Mecanismo radicalario de formación de poliacrilamida.

Tras la formación del gel, se preparan las muestras que queremos analizar mezclando 20 μL de éstas con el Loading Protein Buffer 5x 1:4 (v/v) y calentándolas a 95°C durante 5 minutos. Con esto se pretende desnaturalizar las proteínas que se van a separar en la electroforesis. De estas muestras preparadas, introducimos 5 μL en cada pocillo del gel y se desarrolla la electroforesis convencional aplicando una intensidad de corriente de 25 mA durante aproximadamente 1 hora. La electroforesis terminará cuando los colorantes de referencia, incluidos en el marcador y en las muestras, alcancen una posición concreta en el gel. Es preciso poner en un pocillo un patrón o marcador comparativo que contenga diferentes proteínas cuyas masas moleculares sean perfectamente conocidas. Hay una relación lineal entre el logaritmo de la masa molecular de las proteínas y su Rf (factor de retraso), el cual se calcula respetando la Ecuación 5.

$$Rf = \frac{\text{Distancia de migración de la proteína (cm)}}{\text{Distancia del frente (cm)}}$$

Ecuación 5. Factor de retraso (Rf) en la electroforesis SDS-PAGE.

De esta manera, mediante la realización de un gráfico en el que se compare el logaritmo de la masa molecular y el factor de retraso de las proteínas del marcador, se dilucidará la masa molecular de las proteínas de nuestras muestras.

Por último, el gel se tiñe con una disolución de cloruro de cobre o azul de Coomassie en agua destilada durante 20 minutos. Este gel se destiñe en agua destilada durante 15 minutos. Pasado este tiempo, las bandas del gel de poliacrilamida se observan empleando un transiluminador de luz blanca *Gel Doc™ EZ Imager*.

4.2.15. Caracterización fisicoquímica de polímeros recombinantes

La técnica que se tenía previsto utilizar para realizar la caracterización fisicoquímica del polímero recombinante se explica en el siguiente apartado.

4.2.15.1. *Espectrometría de masas (MALDI-TOF)*

La espectrometría de masas es una técnica analítica instrumental de análisis cualitativo y cuantitativo que permite identificar inequívocamente átomos, compuestos sencillos e incluso compuestos complejos como biomoléculas o biopolímeros. Ésta se trata de la técnica instrumental más completa y potente que existe en la actualidad, puesto que puede proporcionar información estructural de la molécula analizada, de la energía de sus enlaces o incluso información cuántica, isotópica y fisicoquímica de dichos compuestos.

Un espectrómetro de masas es un instrumento que separa los iones que se desplazan rápidamente según su relación m/q , pudiéndose diferenciar varias etapas en el proceso que se realiza en su interior.

En primer lugar la muestra se introduce en el interior del espectrómetro de masas. La forma de introducirla varía y depende de la naturaleza de la muestra. El dispositivo de introducción debe estar diseñado para situar la muestra en el interior del equipo, donde la presión es normalmente inferior a 10^{-6} mbar, y vaporizarla en el caso de que no sea gaseosa. Una vez la muestra gaseosa se introduce en la fuente de iones, las moléculas que la conforman se ionizan (etapa de activación). Dependiendo de las condiciones en las que se realiza esta ionización, los compuestos se fragmentan o no. Esto depende de si la fuente de ionización es fuerte (hay fragmentación) o es débil (no la hay). A continuación, los iones formados son acelerados por la acción de un campo eléctrico (etapa de aceleración) y los iones acelerados son desviados de sus trayectorias iniciales mediante la aplicación de campos eléctricos o magnéticos situados en la zona denominada analizador (etapa de análisis). Sufrirán una mayor o menor desviación, para un mismo valor de la fuerza aplicada, en función de su masa o velocidad. Variando el valor del campo aplicado entre determinados límites, se puede ir dirigiendo de modo consecutivo los iones de diferentes masas, en orden creciente o decreciente, hacia el sistema colector. Finalmente, los iones se detectan cuando llegan al colector dando lugar a una señal eléctrica. Dicha señal, debidamente amplificada, es registrada y se genera un espectro de masas. Este espectro muestra la abundancia de cada fragmento generado en función de su relación masa/carga.

En este trabajo, se empleará un espectrómetro de masas MALDI-TOF para identificar la estructura del recombinámero que se ha obtenido tras la purificación y la liofilización del mismo. Esto significa que la fuente de iones del espectrómetro es la denominada como ionización/desorción por láser asistida por una matriz (MALDI) y que se emplea un analizador de tiempo de vuelo (TOF).

La muestra se disuelve en una disolución hidroalcohólica y ésta se mezcla con un gran exceso de una sustancia matriz capaz de absorber la radiación. La disolución que resulta es evaporada en la superficie de una sonda metálica empleada para la introducción de la muestra. A continuación, esta mezcla sólida se expone a la acción de un láser pulsante provocándose la sublimación del analito a iones, que son introducidos en un espectrómetro de tiempo de vuelo para el análisis de masas. La función de la matriz es la de absorber la radiación emitida por el láser para que no se alteren los niveles rotacionales y vibracionales de la muestra. Los iones generados son acelerados hasta el analizador de tiempo de vuelo. La energía cinética aplicada es idéntica para todos los iones, por lo que la velocidad de éstos únicamente dependerá de su relación masa/carga. Así, los iones con menor relación m/q saldrán los primeros del tubo de vuelo por lo que en el colector se irán recogiendo los iones en orden creciente de relación m/q .

Los espectrómetros de masas MALDI-TOF resultan ideales para el análisis de biopolímeros debido a que el MALDI es una fuente de ionización muy débil (proporciona ausencia total de fragmentación de las moléculas) y a que el TOF es un analizador capaz de analizar un rango de relaciones m/q casi ilimitado (máximo entre 150-300 kDa).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. CONSTRUCCIÓN DE GENES QUE CODIFICAN LOS ELR

El recombinámero tipo elastina que se sintetiza en este trabajo es de naturaleza proteica. Para su producción se emplean técnicas de Biología molecular e Ingeniería genética. Los genes que se emplean para su posterior traducción por células procariotas deben ser diseñados de manera precisa y específica. Si la construcción de los plásmidos ocurre de manera errónea conduciría a la síntesis de la proteína con una conformación no activa. Por ese motivo, la construcción de los plásmidos resulta ser una etapa crítica de la síntesis de recombinámeros, y por ende, debe ser controlada mediante diversas técnicas de análisis.

5.1.1. Descripción de la construcción del gen pDA-ScFv-(EI)x2

En este trabajo, se construye el gen pDA-ScFv-(EI)x2 que se expresa para dar lugar al recombinámero tipo elastina ScFv-(EI)x2. Este ELR es una proteína constituida por dos bloques (bifuncional): el bloque ScFv se emplea para la inmunodetección de agentes bioquímicos (el antígeno VEGF₁₆₅ en este caso) y el bloque (EI)x2, que se muestra en la *Figura 22*, posee actividad estructural puesto que en disolución adquiere conformación micelar hueca.

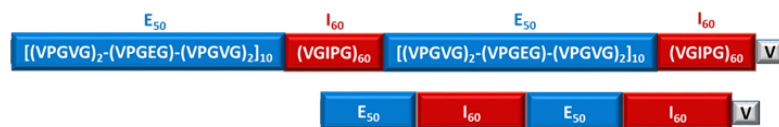


Figura 22. Estructura extendida y esquematizada del tetrabloque (EI)x2.

El nombre que se le otorga a cada uno de estos bloques viene marcado por el aminoácido que muta de la secuencia de aminoácidos consenso VPGVG. Como en el primer bloque se cambia la segunda valina (V) por un ácido glutámico (E), el bloque recibe el nombre de E. Debido a que en dicho bloque la secuencia consenso (ya sea mutada o no) se repite 50 veces, el bloque se denomina E₅₀, aunque durante este trabajo se denominará E o E₅₀ indistintamente. Lo mismo ocurre con el bloque I, puesto que en la secuencia consenso se induce una mutación que cambia la segunda valina (V) por una isoleucina (I). Esta secuencia consenso mutada se repite 60 veces, por lo que el bloque se denominará I₆₀ (o I indistintamente). El bloque E₅₀ posee 10 moléculas de ácido glutámico, por lo que tendrá un fuerte carácter hidrofílico; mientras que el bloque I₆₀ tendrá un fuerte carácter hidrofóbico debido a las 60 isoleucinas de las cuales se compone. El tetrabloque (EI)x2 está compuesto por 220 pentapéptidos lo que implica que su estabilidad sea muy elevada.

La fusión del tetrabloque con una proteína completa cambia, o incluso mejora, las propiedades del recombinámero. En este trabajo se ha adicionado al extremo hidrofílico del tetrabloque (EI)x2 el anticuerpo monocatenario de fragmento variable (ScFv por sus iniciales en inglés) formando el biopolímero ScFv-(EI)x2 (*Figura 23*). Este pequeño fragmento de

anticuerpo procedente de la inmunoglobulina es completamente funcional puesto que es capaz de reconocer y de unirse al antígeno específico denominado factor de crecimiento endotelial-vascular 165 (VEGF₁₆₅ por sus iniciales en inglés)²⁶. Se ha escogido la fusión del tetrabloque con el ScFv, en lugar de la unión de éste con la inmunoglobulina completa, debido a su mayor rapidez a la hora de interactuar con las células y a la hora de eliminarse del riego sanguíneo una vez ha llevado a cabo su función²⁷.



Figura 23. Representación esquemática del recombinámero ScFv-(EI)x2.

Debido a la bifuncionalidad del biopolímero ScFv-(EI)x2, puede utilizarse en el campo de la Biomedicina para encapsular fármacos hidrofóbicos y vehiculizarlos hasta las células endoteliales vasculares del paciente, lugar en el puede presentar actividad dicho medicamento, dado que se une específicamente al factor de crecimiento endotelial-vascular (VEGF₁₆₅).

La técnica de clonación que se lleva a cabo para la construcción del gen pDA-ScFv-(EI)x2 tiene varias etapas. La primera etapa consiste en la linealización del plásmido pDA-(EI)x2 (vector de clonación), para lo que se emplea la enzima de restricción *SapI* (Etapa I-Figura 24). Esta enzima tiene un único sitio de reconocimiento específico en el vector de clonación pDA, por lo que tras la digestión con ella, se obtendrá el plásmido completo linealizado con extremos cohesivos. Las dos hebras son cortadas por la enzima asimétricamente determinando la formación de breves segmentos de cadena simple complementarios entre sí, llamados extremos cohesivos. La secuencia diana de reconocimiento se localiza entre el gen que codifica para el extremo hidrofílico del bloque tetrabloque (EI)x2 y el extremo del vector de clonación adherido a él, por lo cual la inserción de un fragmento génico en este sitio determina la formación de un nuevo gen que une secuencialmente ambos: inserto y gen contenido en el plásmido.

A continuación, se trata dicho gen con las enzimas FastAP y SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) (Etapa II-Figura 24). Ambas poseen actividad quinasa, por lo que eliminan el grupo fosfato que queda expuesto en el extremo 5' de la cadena de DNA (apartado 4.2.6.). Esta defosforilación impide que el DNA vuelva a ciclarse de manera espontánea, pues éste es más estable ciclado que linealizado. El empleo adecuado de las enzimas anteriormente mencionadas asegura una correcta hidrólisis del grupo fosfato. El DNA linealizado y defosforilado podrá unirse a un inserto para dar lugar a un plásmido recombinante.



Figura 24. Esquema de la linealización del gen pDA-(EI)x2. Etapa I: linealización del plásmido. Etapa II: hidrólisis del grupo fosfato.

La segunda etapa se muestra en la Figura 25 y consiste en la obtención del gen ScFv o inserto, que pasa por su extracción desde el plásmido que lo contenía. Este inserto se encuentra implantado en el vector pHTQ-ScFv. Para llevar a cabo la escisión del gen que codifica para el anticuerpo ScFv, se emplean las enzimas de restricción *EarI* y *AanI*. Ambas actúan conjuntamente digiriendo el plásmido en fragmentos de longitud diferenciable y separando el inserto ScFv del vector de clonación pHTQ.



Figura 25. Esquema de la escisión del inserto ScFv a partir del plásmido pHTQ-ScFv.

En la tercera etapa del proceso de clonación se lleva a cabo la reacción de ligación del plásmido linealizado pDA-(EI)x2 y del inserto ScFv. En primer lugar, se procede a realizar la purificación del plásmido y del inserto para que la reacción de ligación ocurra de manera precisa e inequívoca; es decir, sólo se forme un producto de reacción.

Para que la reacción de ligación se produzca, es preciso emplear la enzima T4 DNA ligasa (Figura 26). Ésta posee actividad fosforilasa y ligasa, por lo que primero fusiona los extremos compatibles del plásmido y del inserto y, a continuación, regenera el grupo fosfato del extremo 5' del plásmido linealizado para obtener el gen pDA-ScFv-(EI)x2 circular.

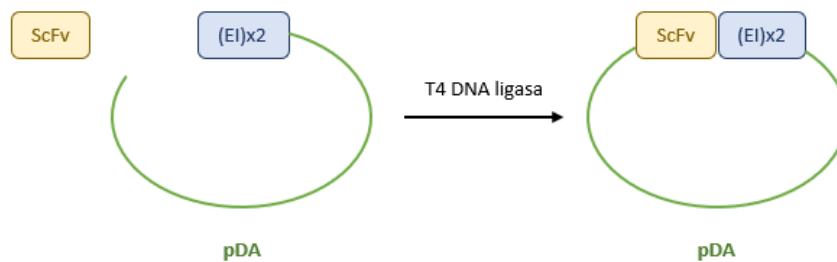


Figura 26. Esquema de la reacción de ligación del plásmido linealizado pDA-(EI)x2 y del inserto ScFv.

Para finalizar la clonación, se realiza una transformación de células competentes Nzy5α con el plásmido pDA-ScFv-(EI)x2 obtenido y se realiza un cultivo bacteriano tal y como se ha explicado en el apartado 4.2.9.4. Así, se amplifica y se aísla (mediante los kits explicados en el apartado 4.2.4.1.) el gen que codifica para el recombinámero ScFv-(EI)x2.

5.1.2. Descripción de la construcción del gen pET7-ScFv-(EI)x2

La técnica de clonación que se realiza para la construcción del gen pET7-ScFv-(EI)x2 tiene varias etapas. La primera etapa consiste en la linealización del plásmido pET7 (vector de expresión) para lo que se utiliza la enzima de restricción *SapI* (Etapa I-Figura 27). Esta enzima tiene un sólo sitio de reconocimiento específico en el vector pET7, por lo que tras la digestión con ella, se obtendrá el plásmido completo linealizado con extremos cohesivos.

A continuación, se trata dicho gen con las enzimas FastAP y SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) (Etapa II-Figura 27). Ambas eliminan el grupo fosfato que queda expuesto en el extremo 5' de la cadena de DNA (apartado 4.2.6.), impidiendo que el DNA vuelva a ciclarse de manera espontánea. El DNA linealizado y defosforilado podrá unirse a un inserto para dar lugar a un plásmido recombinante.

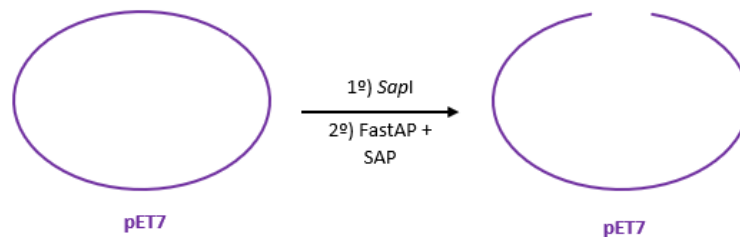


Figura 27. Esquema de la linealización del gen pET7. Etapa I: linealización del plásmido. Etapa II: hidrólisis del grupo fosfato.

La segunda etapa se muestra en la Figura 28 y consiste en la obtención del gen ScFv-(EI)x2 o inserto, que pasa por su extracción desde el plásmido que lo contenía (pDA-ScFv-(EI)x2). Para llevar a cabo la escisión del gen que codifica para ScFv-(EI)x2, se emplea la enzima de restricción *EcoRI*. Esta enzima digiere el plásmido separando el inserto ScFv-(EI)x2 del vector de clonación pDA.



Figura 28. Esquema de la escisión del inserto ScFv-(EI)x2 a partir del plásmido pDA-ScFv-(EI)x2.

En la tercera etapa del proceso de clonación se produce la reacción de ligación del plásmido linealizado pET7 y del inserto ScFv-(EI)x2. En primer lugar, se procede a realizar la purificación del plásmido y del inserto para que la reacción de ligación ocurra de manera precisa e inequívoca y se forme un único producto de reacción.

Para que la reacción de ligación se produzca, es preciso emplear la enzima T4 DNA ligasa (Figura 29). Ésta posee actividad fosforilasa y ligasa, por lo que fusiona los extremos compatibles del plásmido y del inserto, y regenera el grupo fosfato del extremo 5' del plásmido linealizado para obtener el gen pET7-ScFv-(EI)x2 circular.

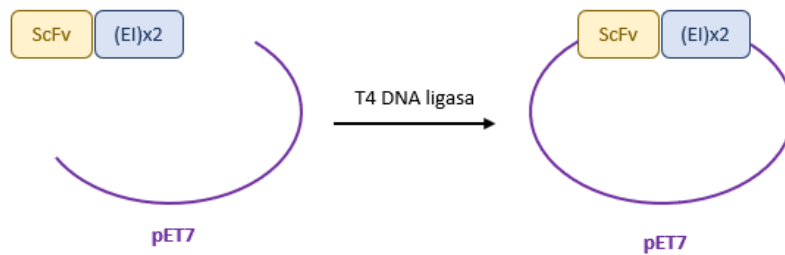


Figura 29. Esquema de la reacción de ligación del plásmido linealizado pET7 y del inserto ScFv-(EI)x2.

Para finalizar la clonación, se realiza una transformación de células competentes *Nzy5α* con el plásmido pET7-ScFv-(EI)x2 obtenido y se realiza un cultivo bacteriano tal y como se ha explicado en el apartado 4.2.9.4. Así, se amplifica y se aísla (mediante los kits explicados en el apartado 4.2.4.1.) el gen que codifica para el recombinámero ScFv-(EI)x2.

5.2. SÍNTESIS EXPERIMENTAL DE GENES RECOMBINANTES

En este trabajo, la célula procariota empleada para la clonación del DNA es la *Escherichia coli*, ya que su uso es el más extendido en la mayoría de los laboratorios de Biología molecular. Además, debido a que los polímeros recombinantes tipo elastina (ELRs) no precisan de modificaciones postraduccionales, no sería necesario utilizar como célula anfitriona organismos eucarióticos²⁸.

5.2.1. Amplificación del plásmido pHTQ-ScFv

Para amplificar el plásmido pHTQ-ScFv, se realiza una transformación en células XL-1 Blue Subcloning Grade (apartado 4.2.9.2.). Tras la transformación y el crecimiento en medio LB-Ampicilina (el vector de clonación pHTQ tiene incorporado un gen de resistencia a la Ampicilina), se lleva a cabo la extracción y la purificación del DNA plasmídico que contienen las bacterias mediante el protocolo *NucleoSpin® Plasmid/Plasmid NoLid* que se explica en el apartado 4.2.4.1.1. Tras obtener el DNA plasmídico purificado en disolución acuosa, se determina su concentración mediante NanoDrop 2000 (apartado 4.2.3.). Su concentración es 782.6 ng/μL.

5.2.2. Escisión del inserto ScFv a partir del plásmido pHTQ-ScFv

Para comprobar que la transformación ha sucedido de manera adecuada, se lleva a cabo una digestión analítica del DNA con las enzimas de restricción *AanI* y *EarI* (Figura 30-Panel A).

Los fragmentos que deben generarse son de número y tamaño conocidos, por lo que se realiza una electroforesis convencional en gel de agarosa analítica (apartado 4.2.1.1.) (Figura 30-Panel B). La endonucleasa *EarI* tiene la capacidad de escindir el inserto ScFv del vector pHTQ y la enzima de restricción *AanI* es capaz de romper los fragmentos de dicho vector para que éstos no se confundan con el gen que codifica para el ScFv.

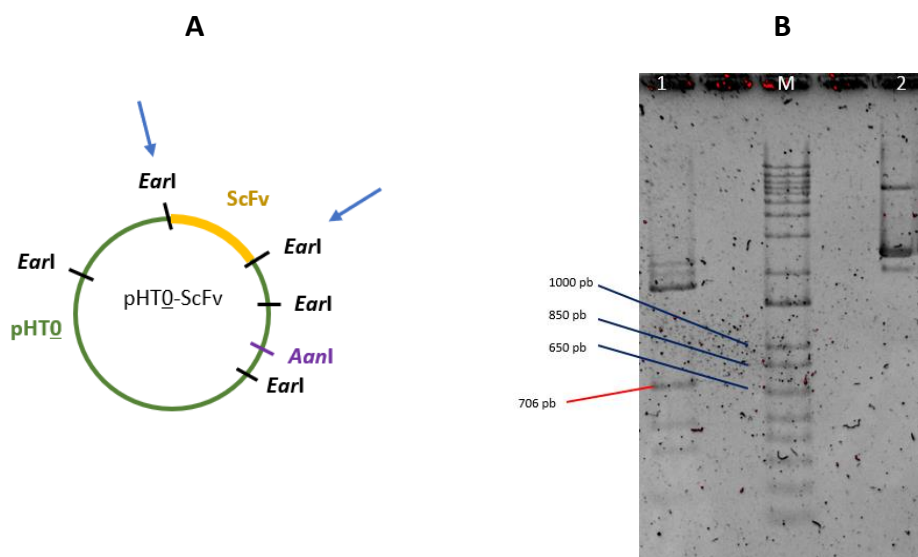


Figura 30. Panel A: Representación de la digestión de pHTQ-ScFv con *AanI* y *EarI* (marcados con flechas azules los puntos de corte que permiten escindir el inserto). Panel B: Electroforesis de digestión analítica de pHTQ-ScFv en gel de agarosa al 1.5% (m/v). La calle M representa el marcador 1 kbPlus DNA Ladder, la calle 1 representa el pHTQ-ScFv codigero con *AanI* y *EarI* y la calle 2 representa el pHTQ-ScFv sin digerir.

Tras comprobar que la digestión ha escindido el inserto ScFv (Figura 25) que posee una longitud de 706 pb, se lleva a cabo la codigestión preparativa del DNA (apartado 4.2.5.) empleando las enzimas endonucleasas *EarI* y *AanI* y una electroforesis preparativa (apartado 4.2.1.2.). En el Panel A de la Figura 31 se observa la banda que corresponde al inserto ScFv. En el Panel B de la Figura 31 se puede observar que mediante el recorte del gel se ha seccionado toda la banda que se corresponde con dicho inserto.

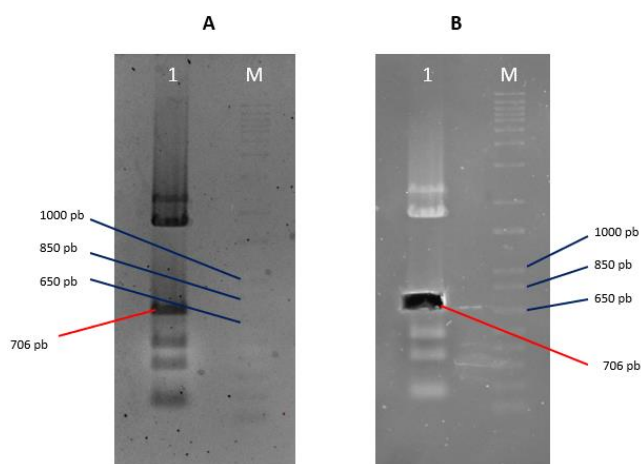


Figura 31. Electroforesis de digestión preparativa con *AanI* y *EarI* del *pHTQ-ScFv* en gel de agarosa al 1.5% (m/v) previa al recorte (Panel A) y posterior al recorte del inserto ScFv (Panel B). En la calle 1 de ambos paneles se observa el *pHTQ-ScFv* codigerido con *AanI* y *EarI*. En la calle M de ambos paneles se observa el marcador 1 kbPlus DNA Ladder.

Para extraer el inserto a partir de la banda recortada del gel en disolución acuosa y purificarlo, se lleva a cabo el protocolo PureLink Quick Gel Extraction (*apartado 4.2.4.2.*). Tras obtener el inserto ScFv en disolución y purificado, determinamos su concentración mediante NanoDrop 2000 (*apartado 4.2.3.*). Su concentración resulta ser 6.2 ng/ μ L.

5.2.3. Amplificación y linealización del plásmido pDA-(EI)x2

Tras obtener el inserto ScFv purificado, se debe obtener el plásmido pDA-(EI)x2 linealizado y puro. Para ello, se debe amplificar previamente el plásmido pDA-(EI)x2. Esto se lleva a cabo realizando una transformación en células XL-1 Blue Subcloning Grade (*apartado 4.2.9.2.*) y su posterior cultivo en medio LB-Ampicilina-Kanamicina (el vector de clonación pDA tiene incorporado un gen de resistencia a la Ampicilina y a la Kanamicina). A continuación, se lleva a cabo la extracción del DNA plasmídico y su purificación mediante el protocolo *NucleoSpin® Plasmid/Plasmid NoLid* (*apartado 4.2.4.1.1.*). Finalmente, se determina su concentración mediante NanoDrop 2000 (*apartado 4.2.3.*) que resulta ser 7.5 ng/ μ L.

Para comprobar que la transformación bacteriana ha sucedido de manera adecuada, se lleva a cabo una digestión analítica del DNA con la enzima de restricción *SapI* y para evitar que el plásmido linealizado vuelva a ciclarse espontáneamente, se hace un tratamiento con las enzimas FastAP y SAP. En este caso, se está llevando a cabo la linealización del plásmido pDA-(EI)x2 (*Figura 24*), lo que implica que sólo se obtendrá un fragmento de DNA cuya longitud alcanzará los 7240 pb.

Tras comprobar que la digestión ha linealizado el plásmido pDA-(EI)x2 de 7240 pb, se lleva a cabo la digestión preparativa del DNA empleando la endonucleasa *SapI* y la defosforilación con la enzimas FastAP y SAP para evitar la recirculación del plásmido. Seguidamente, se realiza

una electroforesis convencional en gel de agarosa preparativa (*apartado 4.2.1.2.*) cuyo resultado se muestra en la *Figura 32.*

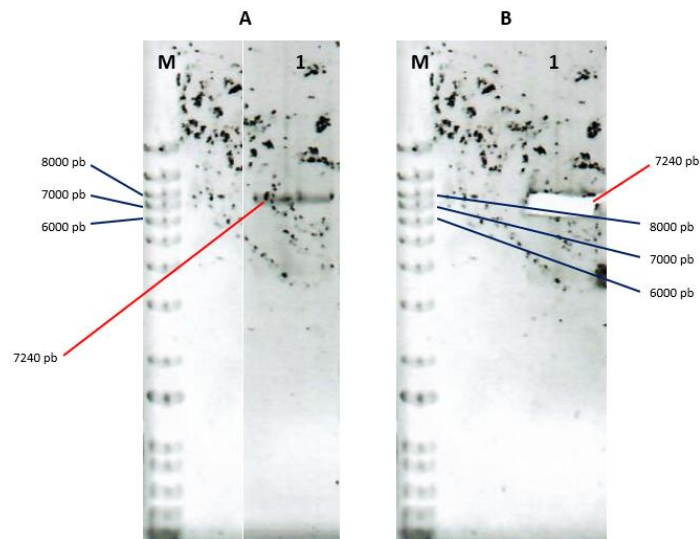


Figura 32. Panel A: *Electroforesis de digestión preparativa con Sapl del plásmido pDA-(EI)x2 en gel de agarosa al 0.8% (m/v) previa al recorte (Panel A) y posterior al recorte del plásmido pDA-ScFv-(EI)x2 (Panel B).* En la calle M de ambos paneles se representa el marcador 1 kbPlus DNA Ladder, mientras que en la calle 1 de ambos paneles se observa el pDA-(EI)x2 digerido con Sapl.

En el *Panel A* de la *Figura 32* se observa la banda que corresponde al plásmido pDA-(EI)x2 linealizado. En el *Panel B* de la *Figura 32* se puede observar que, mediante el recorte del gel, se seccionó toda la banda que se corresponde con el plásmido pDA-ScFv-(EI)x2. Para obtener el plásmido linealizado extraído en disolución acuosa, se lleva a cabo el protocolo PureLink Quick Gel Extraction (*apartado 4.2.4.2.*).

Una vez obtenido el plásmido pDA-(EI)x2 en disolución y purificado, determinamos su concentración mediante NanoDrop 2000 (*apartado 4.2.3.*). La concentración de la disolución es 16.9 ng/μL. Finalmente, se realiza una segunda defosforilación, en este caso con la enzima SAP. Este paso evitará que el plásmido se cierre antes de la ligación. Es esencial asegurar la completa defosforilación del plásmido debido a que mínimas trazas de plásmido fosforilado pueden comprometer la clonación, ya que la capacidad de unión de sus extremos es muy superior a la de las dos moléculas separadas presentes en la disolución (plásmido e inserto).

5.2.4. Reacción de ligación del plásmido linealizado pDA-(EI)x2 y del inserto ScFv

Teniendo en disolución y purificados tanto el plásmido defosforilado como el inserto, se realiza la reacción de ligación (*apartado 4.2.7.*) tal y como esquematiza la *Figura 26.*

Una vez realizada la ligación, el plásmido resultante pDA-ScFv-(EI)x2 se utiliza en la transformación de células competentes Nzy5α (*apartado 4.2.9.4.*). Tras realizar el cultivo de

las células transformadas en medio LB-Ampicilina-Kanamicina (el vector de clonación pDA tiene incorporado un gen de resistencia a la Ampicilina y a la Kanamicina) se efectúa la extracción y la purificación del DNA plasmídico empleando el protocolo *NucleoSpin® Plasmid/Plasmid NoLid* (apartado 4.2.4.1.1.). Por último, se determina su concentración mediante NanoDrop 2000 (apartado 4.2.3.) que es 174.2 ng/μL.

Para comprobar que la reacción de ligación y la transformación han sucedido de manera adecuada, se lleva a cabo una digestión analítica del plásmido pDA-ScFv-(EI)x2 con la enzima *EcoRI*, que escinde el gen que codifica para ScFv-(EI)x2 tal como se muestra en el *Panel A* de la *Figura 33*. El producto de la digestión se corre en una electroforesis en gel de agarosa (*Figura 33-Panel B-calle 1*). Se confirma que estos procesos han ocurrido de manera satisfactoria puesto que aparecen dos bandas esperadas: una a la longitud de 4038 pb que corresponde a la longitud del ELR ScFv-(EI)x2 más 101 pb, un fragmento del plásmido contenido entre los dos sitios de corte y otra banda a la longitud del plásmido pDA menos 101 pb (3908 pb).

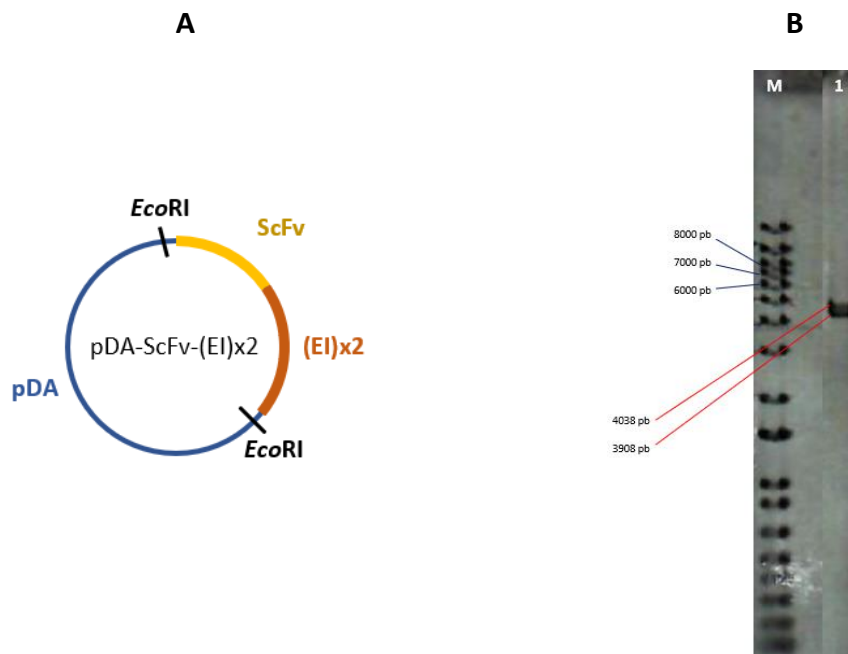


Figura 33. *Panel A: Representación de la digestión de pDA-ScFv-(EI)x2 con EcoRI. Panel B: Electroforesis de digestión analítica con EcoRI del pDA-ScFv-(EI)x2 en gel de agarosa al 1% (m/v). En la calle M se representa el marcador 1 kbPlus DNA Ladder, mientras que en la calle 1 se observa el pDA-ScFv-(EI)x2 digerido con EcoRI.*

Por último, el plásmido pDA-ScFv-(EI)x2 se analiza mediante secuenciación automática (apartado 4.2.10) para comprobar que los nucleótidos de los que se compone son los correctos y se encuentran en el orden adecuado.

5.2.5. Reacción de ligación del plásmido linealizado pET7 y del inserto ScFv-(EI)x2.

Tras los resultados positivos de la secuenciación, el gen que codifica para ScFv-(EI)x2 se subclona en un vector de expresión pET7 (*apartado 4.1.5.2.*) para elevar la capacidad de síntesis de nuestro polímero recombinante por parte de la célula huésped. Este proceso se lleva a cabo realizando las mismas etapas de clonación descritas anteriormente: etapa de digestión con *EcoRI* para extraer el inserto ScFv-(EI)x2 (*Figura 28*), etapa para preparar el plásmido aceptor pET7 (linealización, purificación y defosforilación) (*Figura 27*) y etapa de ligación (*Figura 29*).

A continuación, se realiza una transformación del plásmido pET7-ScFv-(EI)x2 en células competentes *Nzy5 α* según el protocolo del *apartado 4.2.9.4*. Después, se lleva a cabo un cultivo en medio LB-Ampicilina (el vector de clonación pET7 tiene incorporado un gen de resistencia a la Ampicilina) y se purifica el DNA plasmídico obtenido mediante el protocolo NucleoSpin® Plasmid/Plasmid NoLid (*apartado 4.2.4.1.1.*). Finalmente, se determina la concentración de la disolución mediante NanoDrop 2000 (*apartado 4.2.3.*). Ésta resulta ser 72.8 ng/ μ L.

Para comprobar que la subclonación y la transformación se han producido adecuadamente, se realizan dos digestiones analíticas con las enzimas *NdeI* y una codigestión analítica con las enzimas *XbaI* y *XhoI* (*Figura 34*).

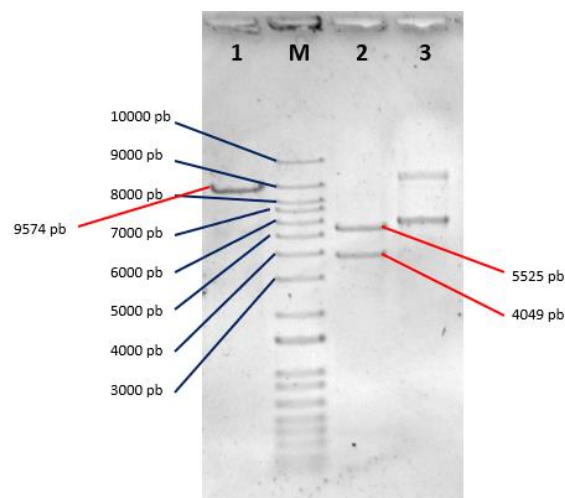


Figura 34. Electroforesis de digestión analítica con *NdeI* y con *XbaI* y *XhoI* del pET7-ScFv-(EI)x2 en gel de agarosa al 0.7% (m/v). En la calle M se representa el marcador 1 kbPlus DNA Ladder, en la calle 1 se observa el pET7-ScFv-(EI)x2 digerido con *NdeI*, en la calle 2 se observa la codigestión del plásmido con *XbaI* y *XhoI* y en la calle 3 el plásmido no digerido.

La endonucleasas *NdeI*, *XbaI* y *XhoI* sólo tienen un sitio de reconocimiento en el plásmido, por lo que aparece un fragmento de DNA con una longitud de 9574 pb digiriendo con la primera de ellas (*Figura 34-calle 1*). Sin embargo, la codigestión con las enzimas *XbaI* y *XhoI* (*Figura 34-calle 2*), que tienen sus secuencias diana en el plásmido pET7-ScFv-(EI)x2 a sendos extremos

del gen, determinan la aparición de dos bandas correspondientes al inserto ScFv-(E1)x2 (4049 pb) y al vector de expresión pET7 (5525 pb). En la calle del plásmido no digerido (*Figura 34-calle 3*) se observan las formas principales de enrollamiento y compactación del DNA plasmídico correspondientes al plásmido relajado (menor movilidad electroforética) y al plásmido superenrollado que, debido a su conformación compacta, se mueve a través del gel más rápidamente (mayor movilidad electroforética).

Como los resultados obtenidos son los esperados, se comienza la bioproducción del recombinámero a gran escala.

5.3. BIOPRODUCCIÓN DE ELR

En este trabajo se ha realizado la bioproducción del recombinámero ScFv-(E1)x2, cuyo peso molecular teórico es de 117885.75 Da. Este ELR ha sido posteriormente purificado y caracterizado mediante diferentes técnicas.

En este momento interesa no sólo que los genes se repliquen de manera correcta, sino que la traducción y expresión de dichos genes sea considerable. De este modo, la producción de polímero proteico será la mayor posible. Para ello se realiza una transformación bacteriana en células BLR (DE3) (*apartado 4.2.9.1.*). Esta cepa es deficiente en sistemas de recombinación del DNA y en algunas proteasas, lo que provoca que los productos génicos y los proteicos sean más estables.

La realización de una electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida (*apartado 4.2.14.*) nos muestra cuál de las colonias bacterianas aisladas en placas de Petri es la más productora; es decir, la que más recombinámero genera en el mismo tiempo que el resto de colonias.

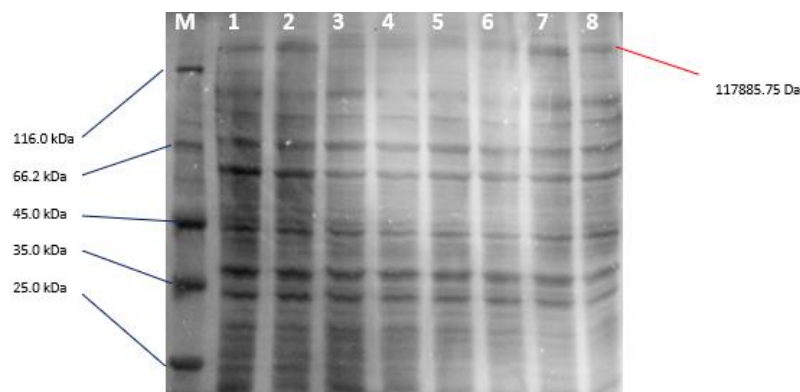


Figura 35. *Screening del ScFv-(E1)x2 en gel SDS-PAGE al 10%. En la calle M se representa el marcador Unstained Protein Molecular Weight Marker y en las calles 1-8 se observan las colonias bacterianas 1-8.*

En la *Figura 35* se analiza el contenido proteico total de las colonias bacterianas que contienen el plásmido recombinante ScFv-(E1)x2, banda señalada con una línea roja. A diferencia de las

proteínas propias de las bacterias que presentan un nivel de producción similar, las proteínas recombinantes pueden ser producidas con distinto rendimiento. En este barrido se observó que las colonias más productoras eran la 2 y la 7, por lo que se han elegido para la generación de su biomasa en el fermentador con el fin de conseguir una cantidad apreciable del recombinámero ScFv-(EI)x2 (*apartado 4.2.11.*).

La absorbancia de las diluciones del inóculo, del control y de las muestras a diferentes horas se muestran en la *Tabla 7*.

Muestra	pH	Tª (°C)	% O ₂	rpm	mL OH ⁻	Presión (bar)	A ^{600nm}	Dilución (v:v)
16:35	7.04	37.0	103.0	499	3	0.4	-	1:1
8:00	6.76	37.0	44.8	500	-	-	12.7920	1:20
8:30	6.71	37.0	44.5	499	-	-	13.0940	1:20
Inóculo	-	-	-	-	-	-	2.1170	1:10
Control	-	-	-	-	-	-	9.8160	1:10

Tabla 7. Valores de los parámetros medidos durante el funcionamiento del fermentador.

Cuando las absorbancias medidas con media hora de diferencia se mantienen prácticamente constantes, se para el fermentador, pues las células se encuentran en la fase de crecimiento estacionario. También se realiza una electroforesis de proteínas para confirmar que se ha bioproducido el recombinámero correcto (*Figura 36*).

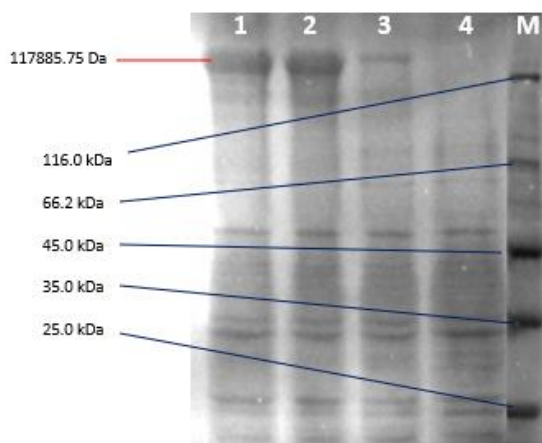


Figura 36. Electroforesis de proteínas del crudo de ScFv-(EI)x2 obtenido del reactor. En la calle M se representa el marcador Unstained Protein Molecular Weight Marker, en la calle 1 se observa el crudo del reactor a las 8:00h, en la calle 2 el crudo del reactor a las 8:30h, en la calle 3 el control y en la calle 4 el inóculo.

Por último, se realiza el lavado de las células, la ruptura de las mismas, el aislamiento del polímero (*apartado 4.2.12.*) y su purificación (*apartado 4.2.13.*).

5.3.1. Aislamiento del recombinámero

El lisado bruto bacteriano, que se obtiene tras la sonicación, se somete a una centrifugación para aislar el polímero de interés contenido en el sobrenadante (*apartado 4.2.12.*) de los restos celulares contenidos en el pellet (*Figura 19*). Para llevar un control de la etapa de aislamiento del recombinámero, se realiza una electroforesis de proteínas que permite identificar la porción de muestra en la que se encuentra el ScFv-(E1)x2 (*Figura 37*).

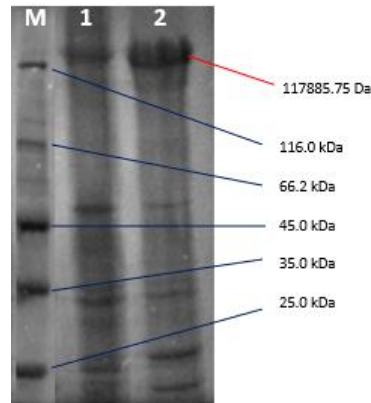


Figura 37. Electroforesis de proteínas tras el aislamiento de ScFv-(E1)x2. En la calle M se representa el marcador Unstained Protein Molecular Weight Marker, en la calle 1 se observa el sobrenadante tras la sonicación y en la calle 2 el precipitado tras la sonicación.

La *calle 2* de la *Figura 37* corresponde al precipitado donde se localiza una gran cantidad de recombinámero. Este hecho se debe a que la consistencia viscosa del precipitado obtenido no ha permitido su completa separación del sobrenadante. A pesar de ello, la purificación se continúa con el sobrenadante (*calle 1*), pues así lo estipula el protocolo de purificación EL₂RGD₂.

Como se ha indicado en el *apartado 4.2.13.*, para llevar a cabo la purificación del polímero se utiliza un método denominado ciclo de transición inversa (ITC) que tiene en cuenta la temperatura de transición del polímero recombinante. Este método precisa de varias etapas de calentamiento (precipitación del ELR), centrifugación y enfriamiento (solubilización del ELR).

5.3.2. Primera etapa de purificación: calentamiento

Se lleva a cabo el primer calentamiento a 42°C y la salinización del sobrenadante que contiene, junto con otras proteínas, el polímero recombinante (*Etapa I-Figura 20*) y se somete a centrifugación. Para llevar un control de la primera etapa de purificación, se lleva a cabo una electroforesis de proteínas que permite identificar en qué porción de muestra se encuentra el recombinámero (*Figura 38*).

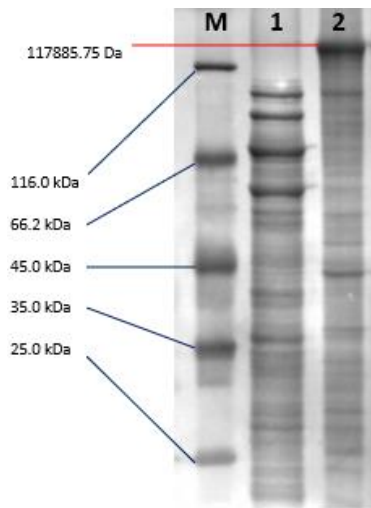


Figura 38. *Electroforesis de proteínas tras el primer calentamiento de ScFv-(EI)x2. En la calle M se representa el marcador Unstained Protein Molecular Weight Marker, en la calle 1 se observa el sobrenadante tras el primer calentamiento y en la calle 2 el precipitado tras el primer calentamiento.*

La *calle 2* de la *Figura 38* corresponde al precipitado. Se puede observar la banda del recombinámero ScFv-(EI)x2 a 117885.75 Da, aproximadamente. El resto de las proteínas de la disolución no poseen temperatura de transición, por lo que se mantienen en el sobrenadante (*calle 1*).

5.3.3. Segunda etapa de purificación: enfriamiento

Tras el primer calentamiento, la purificación continúa con el precipitado. El pellet es resuspendido en una disolución 1mM de ditioneitol (DTT) y la disolución resultante es sometida al primer enfriamiento a 4°C (*Etapa II-Figura 20*), tras lo que se realiza una centrifugación. Para llevar un control de la segunda etapa de purificación, se lleva a cabo una electroforesis de proteínas cuyo resultado se muestra en la *Figura 39*.

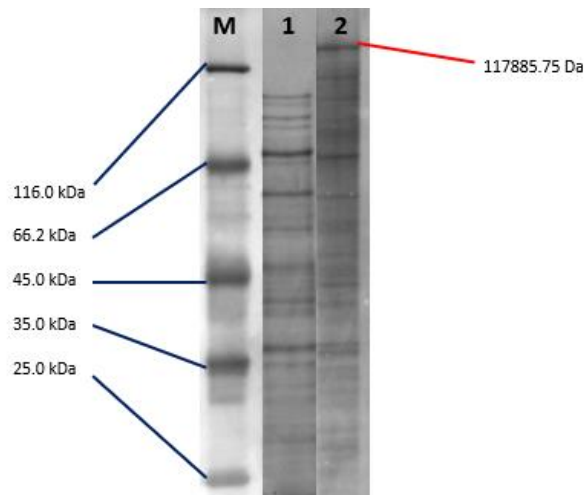


Figura 39. *Electroforesis de proteínas tras el primer enfriamiento de ScFv-(El)x2. En la calle M se representa el marcador Unstained Protein Molecular Weight Marker, en la calle 1 se observa el precipitado tras el primer enfriamiento y en la calle 2 el sobrenadante tras el primer enfriamiento.*

El recombinámero, debido a su temperatura de transición, debería encontrarse como precipitado a temperaturas elevadas, y en disolución a temperaturas bajas. Si observamos la electroforesis (Figura 39) se confirma que el ELR se localiza en el sobrenadante (calle 2) y el resto de las proteínas se mantienen en el precipitado (calle 1).

El sobrenadante es sometido a dos nuevos ciclos de calentamiento-enfriamiento para conseguir eliminar todos los contaminantes; y se somete a diálisis reductora con disoluciones de 25 L de DTT (Figura 40) y sales de guanidina en agua destilada y ultrapura a 4°C para obtener la conformación activa de la proteína recombinante.

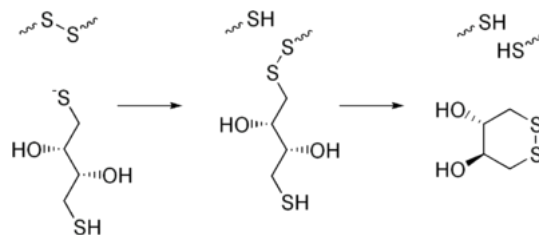


Figura 40. *Reacción de reducción de los puentes disulfuro en presencia de DTT.*

Finalmente, la disolución se liofiliza para obtener el polímero purificado y seco. Éste se deberá caracterizar tanto física como químicamente mediante la técnica espectrométrica MALDI-TOF. Esta etapa de caracterización no ha podido ser realizada debido a las restricciones impuestas por el confinamiento.

6. CONCLUSIONES

1. Se ha diseñado un nuevo polímero proteico para aplicaciones biomédicas: ScFv-(EI)x2. Este polímero (ELR) es termo-sensible y se autoensambla en nanoestructuras micelares en disolución acuosa. Para funcionalizar el polímero y la micela, se ha integrado en su secuencia el anticuerpo ScFv. El nivel de complejidad de la molécula diseñada no permite su obtención mediante síntesis química tradicional, por lo que se ha obtenido por sintetizar el biopolímero en un sistema bacteriano empleando técnicas bioquímicas y de Ingeniería genética.
2. Se han empleado metodologías de la Biología molecular, como la clonación, para obtener insertos génicos e implantarlos en diferentes tipos de vectores y así obtener DNA recombinante. Todos estos procesos han sido seguidos por técnicas de análisis para comprobar su correcta realización.
3. El uso de antibióticos permite discernir entre las bacterias *E. coli* que han introducido en su citoplasma el DNA recombinante de las que no lo han hecho. Además, la elección del antibiótico que se va a emplear en cada uno de los cultivos depende únicamente de la resistencia a antibióticos que tenga el vector plasmídico de dicho DNA.
4. Se ha escogido la colonia que más cantidad de polímero producía y cuya producción era de mayor calidad. Se ha realizado un cultivo de 15 L de dicha colonia en el fermentador para obtener grandes cantidades del recombinámero ScFv-(EI)x2, llevando un control exhaustivo de los parámetros que lo regían. Esta inspección fue determinante para obtener muy buenos resultados en la bioproducción del ELR.
5. Como método de purificación del ELR sintetizado se han llevado a cabo varios ciclos de transición inversa. Con el fin de optimizar la pureza del recombinámero ScFv-(EI)x2, se ha adecuado esta purificación a la naturaleza química del mismo. Por ello, no sólo se tiene en cuenta su T_t , sino también la estructura primaria del mismo.
6. La purificación del ScFv-(EI)x2 ha ocurrido de manera satisfactoria. Sin embargo, hay porciones de ésta que deben ser sometidas a una nueva purificación para mejorar el rendimiento del proceso.
7. No se ha podido llevar a cabo de forma completa la caracterización fisicoquímica mediante la técnica espectrométrica MALDI-TOF, a pesar de ser uno de los objetivos propuestos para el trabajo, por las circunstancias de la COVID-19.
8. Sería interesante en próximos estudios determinar la funcionalidad del ScFv-(EI)x2 como posible encapsulador de fármacos hidrofóbicos y su vehiculización a células endoteliales vasculares del ser humano.

7. BIBLIOGRAFÍA

¹ J.O. Hollinge; *An introduction to biomaterials*. 2nd Edition. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group; 2012.

² <https://dle.rae.es/biomaterial>. Fecha de consulta: 01/08/2020.

³ F.C. Montoliu; *Biomateriales I. Clasificación de los Materiales*. Rev. R. Acad. Med. Catalunya (vol. 6). Pages 139-151; 1993.

⁴ <https://dicciomed.usal.es/palabra/elastina>. Fecha de consulta: 16/08/2020.

⁵ E. Petersen, F. Wåggberg, K.A.A. Angquist; Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. (vol. 24). Pages 440-444; 2002.

⁶ M.A. Morelli, M. DeBiasi, A. DeStradis, A. M. Tamburro; J. Biomol. Struct. Dyn. (vol. 11). Pages 181-190; 1993.

⁷ H. Reiersen, A. R. Clarke, A. R. Rees; J. Mol. Biol. (vol. 32). Pages 255-264; 1998.

⁸ A. Krukau, I. Brovchenko, A. Geiger; *Temperature-Induced Conformational Transition of a Model Elastin-like Peptide GVG(VPGVG)₃ in Water*; Biomacromolecules (vol. 8). Pages 2196-2202; 2007.

⁹ D.W. Urry; *What Sustains Life? Consilient Mechanisms for Protein-Based Machines and Materials*, Springer-Verlag, New York; 2006.

¹⁰ D.W. Urry; *Entropic elastic processes in protein mechanisms. I. Elastic structure due to an inverse temperature transition and elasticity due to internal chain dynamics*, Journal of Protein Chemistry. Pages 1-34; 1988.

¹¹ T. Kowalczyk, K. Hnatuszko-Konka, A. Gerszberg, A.K. Kononowicz; *Elastin-like polypeptides as a promising family of genetically-engineered protein based polymers*, World J Microbiol Biotechnol. Pages 2141–2152; 2014.

¹² D.T. McPherson, C. Morrow, D.S. Minehan, J. Wu, E. Hunter, D.W. Urry; Biotechnol. (vol. 8). Pages 347-352; 1992.

¹³ J.C. Rodríguez-Cabello, A. Girotti, A. Ribeiro, F.J. Arias; Methods Mol. Biol. (vol. 811). Pages 17-38; 2012.

¹⁴ S. Roberts, S. Costa, J. Schaal, J.R. Simon, M. Dzuricky, F.G. Quiroz, A. Chilkoti; *Elastin-Like Polypeptides*, Elsevier Ltd. Pages 100-103; 2017.

¹⁵ D.W. Urry; Methods Enzymol. (vol. 82). Pages 673-716; 1982.

¹⁶ L. Quintanilla-Sierra, C. García-Arévalo, J.C. Rodríguez-Cabello; *Self-assembly in elastin-like recombinamers: a mechanism to mimic natural complexity*, Materials Today Bio (vol. 2); 2019.

- ¹⁷ J.R. McDaniel, S.R. Macewan, M. Dewhurst, A.J. Chilkoti; *Control* (vol. 159). Pages 362–367; 2012.
- ¹⁸ E.R. Wright, V.P. Conticello; *Self-assembly of block copolymers derived from elastin-mimetic polypeptide sequences*, *Advanced Drug Delivery Reviews* (vol. 54). Pages 1057–1073; 2002.
- ¹⁹ R. Glockshuber, M. Malia, I. Pfitzinger, A. Plückthun; *A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments*, *Biochemistry* (vol. 29). Pages 1362-1367; 1990.
- ²⁰ I.B. Rogozin, V.V. Solovyov, N.A. Kolchanov; *Somatic Hypermutagenesis in immunoglobulin genes. I. Correlation between somatic mutations and repeats. Somatic mutation properties and clonal selection*. *Biochimica et Biophysica Acta* (vol. 1089). Pages 175-182; 1991.
- ²¹ U. Conrad, I. Plagmann, S. Malchow, M. Sack, D.M. Floss, A.A. Kruglov; *ELPylated anti-human TNF therapeutic single-domain antibodies for prevention of lethal septic shock*. *Plant Biotechnol J.* (vol. 9). Pages 22–31; 2011.
- ²² F. Hu, T. Ke, X. Li, P.H. Mao, X. Jin, F.L. Hui, X.D. Ma, L.X. Ma; *Appl. Biochem. Biotechnol.* (vol. 160). Pages 2377-2387; 2010.
- ²³ A.S. Soon, M.H. Smith, E.S. Herman, L.A. Lyon, T.H. Barker; *Adv. Healthc. Mater.* (vol. 2). Pages 1045–1055; 2013.
- ²⁴ A. Ribeiro; *Functionality development in systems based on Elastin-like recombinamers: From nano-objects to macrogels*, PhD Thesis; 2008.
- ²⁵ A. Girotti; *Desarrollo de una plataforma biotecnológica para la obtención de polímeros recombinantes tipo elastina*, PhD Thesis; 2007.
- ²⁶ Z. Lin, P. Cao, H. Lei; *Identification of a Neutralizing ScFv Binding to Human Vascular Endothelial Growth Factor 165 (VEGF165) Using a Phage Display Antibody Library*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* (vol. 144). Pages 15-26; 2008.
- ²⁷ A.L. Nelson; *Antibody fragments*. *MAbs.* (vol. 2). Pages 77–83; 2010.
- ²⁸ J.C. Rodríguez-Cabello, A. Ibáñez, M. Alonso, L. Poczka, F. Cipriani, I. González; *Elastin-Like Polymers: Properties, Synthesis, and Applications*. *Encyclopedia of Polymer and Technology*. Pages 5-7; 2017.

8. ABREVIATURAS

Las abreviaturas utilizadas en este trabajo son, en orden de aparición, las siguientes.

Abreviatura	Nombre completo	Abreviatura	Nombre completo
ELR	Recombinámero tipo elastina	SAP	Fosfatasa alcalina de camarón
ScFv	Anticuerpo monocatenario de fragmento variable	[cfu]	Unidad formadora de colonias
pDA	pDriveAll	Rf	Factor de retraso
E. coli	Escherichia coli	LB	Lysogeny Broth
(VPGVG)	Pentapéptido VPGVG	TB	Terrific Broth
(VPGVG)_n	Polipentapéptido VPGVG	S.O.C.	Super Optimal Broth
T_t	Temperatura de transición	DTT	Ditiotreitol
ELbcR	Correcombinámero tipo elastina de bloques	M_r	Masa molecular relativa
VEGF₁₆₅	Factor de crecimiento endotelial-vascular 165	FastAP	Fosfatasa alcalina termosensible
TEMED/TMEDA	Tetrametiletilendiamina	[pb]	Pares de bases
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PSA	Persulfato amónico	A	Absorbancia
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	LOQ	Límite de cuantificación
SDS	Dodecilsulfato sódico	RNAasa	Ácido ribonucleasa
DMSO	Dimetilsulfóxido	SPE	Extracción en fase sólida
PMSF	Fluoruro de fenilsulfonilmetano	rDNA	Ácido desoxirribonucleico recombinante
BSA	Albúmina sérica bovina	[rpm]	Revoluciones por minuto
ATP	Adenosín trifosfato	ITC	Ciclo de transición inversa
TSS	Solución de almacenamiento y transformación	PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PEG	Polietilenglicol	m/q	Masa/carga
TAE	Tris-ácido acético-EDTA	[Da]	Dalton
BPB	Azul de bromofenol	MW	Masa molecular

Código de representación de bases nitrogenadas

Base nitrogenada	Abreviatura
Adenina	A
Citosina	C
Guanina	G
Timina	T
Uracilo	U

Código de representación de aminoácidos

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