



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

**Biopolímeros para la síntesis de nanopartículas en dosificación de
fármacos**

Autor:

Alejandro del Hierro González

Tutor/es:

Dr. F. Javier Arias

Dra. Alessandra Girotti

Agradecimientos

A mi familia, porque sin ellos no podría haberlo conseguido.

A Javier y Alessandra, por haberme mostrado la investigación en un fantástico campo científico.

A Irene y Sara, por el compañerismo y el ambiente generado durante estos meses, vitales para la consecución de los propios objetivos.

Índice

1- Resumen/Abstract	1
2- Introducción	2
2.1- Biología molecular e ingeniería genética.....	2
2.2- Tecnología del ADN recombinante	2
2.3- Biomateriales.....	4
2.4- Sistemas de dosificación de fármacos	5
2.4.1- Elastina y polipéptidos tipo elastina.....	6
2.4.2- Nanopartículas basadas en ELPs.....	8
3- Objetivos	10
4- Materiales y métodos	11
4.1- Materiales	11
4.1.1- Reactivos químicos	11
4.1.2- Soluciones tamponadas.....	11
4.1.3- Materiales para biología molecular.....	12
4.1.3.1- Cepas bacterianas.....	12
4.1.3.2- Medios de cultivo	12
4.1.3.3- Enzimas de restricción y ligasa	13
4.1.3.4- Vectores plasmídicos.....	14
4.1.3.5- Genes sintéticos y plásmidos base.....	15
4.1.3.6- Kits de extracción y purificación de ADN.....	16
4.2- Métodos.....	16
4.2.1- Reacción de ligación.....	16
4.2.2- Preparación de placas de cultivo bacteriano	17
4.2.3- Transformación en cepas bacterianas	17
4.2.3.1- Transformación en DH5α <i>Competent Cells</i>	17
4.2.3.2- Transformación en <i>BLR(DE3) Competent Cells</i>	18
4.2.3.3- Transformación en SHuffle® T7 <i>Express Competent E. coli</i>	18
4.2.4- Purificación de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	18
4.2.5- Digestión analítica de ADN con enzimas de restricción	20
4.2.6- Electroforesis de ADN en geles de agarosa	20
4.2.7- Secuenciación de ADN.....	22
4.2.8- Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.....	22

4.2.9- Bioproducción de proteínas recombinantes.....	24
4.2.10- Extracción y purificación proteica	26
4.2.10.1- Sonicación celular e ITC.....	26
4.2.10.2- Extracción orgánica y precipitación en acetonitrilo.....	27
4.2.11- Caracterización de polipéptidos tipo elastina	27
4.2.11.1- Espectrometría de masas MALDI-TOF.....	27
4.2.11.2- Resonancia Magnética Nuclear de protón (¹ H-RMN).....	28
4.2.11.3- Análisis de aminoácidos por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	29
4.2.11.4- Dispersión dinámica de la luz (DLS).....	29
4.2.11.5- Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	30
5- Resultados y discusión.....	31
5.1- Síntesis del polímero (SI) ₂	31
5.1.1- Ligación del inserto (SI) ₂ con el plásmido pET7 y amplificación del p7(SI) ₂	31
5.1.2- Digestión analítica del p7(SI) ₂	31
5.1.3- Bioproducción del (SI) ₂	32
5.1.4- Purificación.....	35
5.1.5- Caracterización del biopolímero	38
5.1.5.1- Determinación de la masa molecular aparente por SDS-PAGE	38
5.1.5.2- Análisis de la composición por ¹ H-RMN.....	39
5.1.5.3- Determinación de la masa molecular por MALDI-TOF.....	40
5.1.5.4- Análisis de la formación de nanopartículas mediante DLS	40
5.1.5.5- Determinación de la temperatura de transición mediante DSC	41
5.1.5.6- Determinación de la composición aminoacídica mediante HPLC	42
5.2- Síntesis del polímero 3CK ₂₄ (SI) ₂	42
5.2.1- Bioproducción del 3CK ₂₄ (SI) ₂	42
5.2.2- Purificación.....	44
5.2.2.1- Purificación por ITC.....	44
5.2.2.2- Purificación por extracción con disolventes orgánicos y precipitación en acetonitrilo.	47
5.2.3- Caracterización del biopolímero	48
5.2.3.1- Determinación de la masa molecular aparente por SDS-PAGE	48
5.2.3.2- Análisis de la composición por ¹ H-RMN.....	49
5.2.3.3- Determinación de la masa molecular por MALDI-TOF.....	50
5.2.3.4- Determinación de la temperatura de transición mediante DSC	50
5.2.3.5- Determinación de la composición aminoacídica mediante HPLC	50

5.3- Síntesis del 3K(EI) ₂	51
5.3.1- Purificación por extracción con disolventes orgánicos y precipitación en acetonitrilo.....	51
5.3.2- Caracterización del biopolímero.....	53
5.3.2.1- Determinación de la masa molecular aparente por SDS-PAGE.....	53
5.3.2.2- Análisis de la composición por ¹ H-RMN.....	55
5.3.2.3- Determinación de la masa molecular por MALDI-TOF.....	55
5.3.2.4- Determinación de la temperatura de transición mediante DSC.....	55
5.3.2.5- Determinación de la composición aminoacídica mediante HPLC.....	56
6- Conclusiones.....	57
7- Bibliografía.....	58
8- Anexo.....	60
8.1- Espectros de ¹ H-RMN.....	60
8.2- MALDI-TOF del (SI) ₂	61
8.3- MALDI-TOF del 3CK ₂₄ (SI) ₂	62
8.4- MALDI-TOF del 3K(EI) ₂	63
8.5- Termogramas obtenidos por DSC.....	64
8.6- Abreviaturas.....	66

1- Resumen

De la necesidad de poder suministrar un medicamento evitando todo tipo de efectos secundarios en el paciente, así como potenciando la eficacia del mismo una vez este ingresa en el organismo, sin que sea necesario el uso de varias dosis de este, nacen los sistemas de dosificación controlada de fármacos. De entre todos los vehículos que se pueden utilizar para conseguir este fin, se han elegido los polipéptidos tipo elastina (ELPs), capaces de formar estructuras en forma de nanopartícula donde portar el fármaco a transportar por el cuerpo, sin generar rechazo ni productos tóxicos en su degradación.

El siguiente trabajo tuvo como fin la síntesis de dos polímeros tipo elastina, el (SI)₂ y el 3CK₂₄(SI)₂, así como su purificación, caracterización y evaluación a la hora de formar nanopartículas en disolución acuosa gracias a su naturaleza anfifílica. Como vector de producción se utilizó *E. coli*, debido a la sencillez de su manejo y la facilidad de introducir en su maquinaria proteica ADN recombinante plasmídico, que codificaba para nuestras proteínas en cuestión. Paralelamente, también se inició la puesta a punto de un nuevo protocolo de purificación con el polímero 3K(EI)₂.

Abstract

The necessity to be able to administer a drug without side effects in the patient, and with an enhancing efficiency for penetrating in the organism, without using several doses of drug, led to the creation of controlled drug delivery systems. Among all the vehicles that can be used to achieve this goal, elastin-like polypeptides (ELPs) have been chosen because of its ability to form nanoparticle-shaped structures to carry the drug and transport it through the body, without generating rejection or toxic products during its degradation.

The following work was aiming at the synthesis of two elastin-like polymers, (SI)₂ and 3CK₂₄(SI)₂, as well as their purification, characterization and the evaluation of their nanoparticle-formation ability in aqueous solution thanks to their amphiphilic nature. *E. coli* was used as production vector, due to its handling simplicity and the ease of introducing recombinant plasmid DNA into its protein machinery, which coded for our proteins of interest. In parallel, a new purification protocol was tested with the 3K(EI)₂ polymer, too.

2- Introducción

2.1- Biología molecular e ingeniería genética

Se define la biología molecular como el campo de la ciencia que estudia a los seres vivos y los procesos que ocurren en su interior desde el punto de vista de sus macroestructuras: polisacáridos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Dos corrientes bien diferenciadas forman parte de esta disciplina: la estructuralista, que se encarga del estudio a nivel atómico de los componentes celulares, solapándose con la bioquímica estructural; y la informacionista, cuyo punto de mira es la transmisión de información biológica de generación en generación, compartiendo materia de estudio con la genética.

El flujo de la información genética, por lo tanto, ocurre de manera que una molécula de ADN sufre el proceso de transcripción, por el cual la información que contiene es codificada en una molécula de ARN y que, mediante la traducción, será transformada en una serie de aminoácidos que conformarán una proteína final. En resumen, el ADN celular tiene como misión la expresión de proteínas a través de moléculas intermediarias, los ARN (Figura 1).

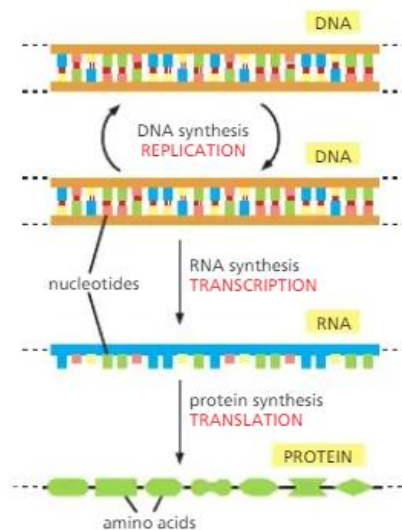


Figura 1. Dirección del flujo de información genética¹.

El conjunto de técnicas que permiten la manipulación del ADN se conoce como ingeniería genética, permitiendo desde la transferencia de ADN de un organismo a otro, introduciéndolo en sus propias secuencias génicas y creando organismos modificados genéticamente, hasta la replicación de moléculas de ADN, obteniendo muchísimas copias a partir de una inicial. De esta manera, por extrapolación a lo anteriormente descrito, se es incluso capaz de sintetizar proteínas gracias a la modificación del ADN de un ser vivo, aprovechando su maquinaria celular.

2.2- Tecnología del ADN recombinante

El proceso comienza con la clonación del ADN (Figura 2), una herramienta de la ingeniería genética que se basa en la obtención de múltiples copias de una secuencia génica de interés, en

este caso, la que codifica para el polipéptido deseado. Si el objetivo es la amplificación de ADN, se utilizan vectores de clonación.

Un vector es una molécula de ADN bicatenario, pequeña y fácilmente aislable con capacidad de albergar ADN exógeno (o inserto) y replicarse dentro de la célula anfitriona con independencia del ADN genómico. Este vector, de secuencia conocida, poseerá un gen marcador que permita a la célula hospedadora diferenciarse del resto de células, dotándola de, por ejemplo, resistencia a un determinado antibiótico.

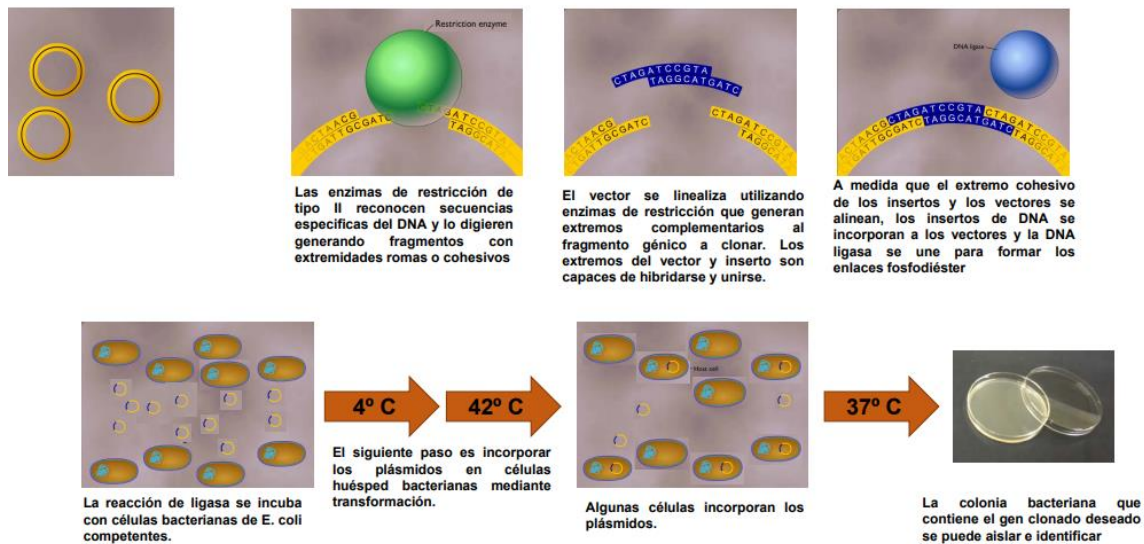


Figura 2. Resumen del proceso de clonación.

Los vectores más comúnmente utilizados son los plásmidos, que poseen un tamaño medio de 5000 pares de bases (pb), mientras que los insertos introducidos cuentan con un tamaño máximo de 10 kpb. Para la introducción del inserto dentro del vector de clonaje, se deben utilizar enzimas de restricción. Una enzima es una proteína con actividad catalítica en un determinado proceso químico o biológico dentro de las células, aumentando su velocidad en grandes órdenes de magnitud. Dentro de dicho grupo encontramos las enzimas de restricción, que son nucleasas que cortan segmentos de ADN interno (endonucleasas) cuando reconocen una secuencia específica o diana, siempre en la misma posición. Existen de tipo I, II, III, IV y V, siendo más interesantes para nuestro trabajo las de tipo II puesto que apuntan a unos nucleótidos específicos de la secuencia diana, normalmente palindrómica. Al tratar el vector y el fragmento de ADN de donde queremos obtener el inserto con la misma enzima de restricción, podremos generar secuencias complementarias debido a que proporcionan o bien extremos romos (*blunt ends*, la enzima corta en el eje del palíndromo) o cohesivos (*sticky ends*, el corte deja entre 2 y 4 nucleótidos desapareados en los extremos), en función de la enzima utilizada (Figura 3).

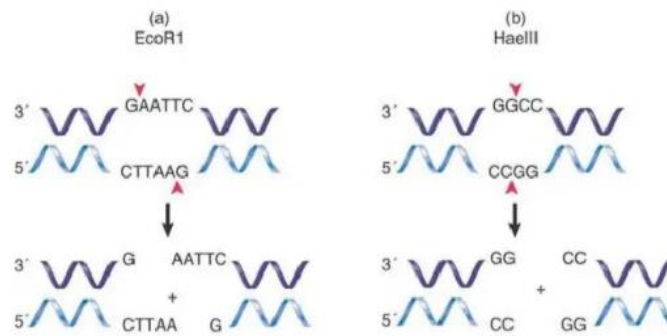


Figura 3. Representación gráfica de los cortes producidos por enzimas de restricción, siendo a) cohesivos y b) romos².

La reacción que permite la unión del inserto con el vector a través de las secuencias complementarias generadas por la enzima de restricción se denomina ligación, y la lleva a cabo la ADN Ligasa (Figura 2). Para continuar con la clonación, se ha de introducir este vector recombinante en el interior de la célula hospedadora mediante el proceso de transformación.

Mediante ella las células captan ADN exógeno al encontrarse en el denominado “estado de competencia”, que puede ser natural o inducido mediante, por ejemplo, un cambio fisicoquímico como la temperatura, el cual provoca que se abran microporos en la membrana celular que permiten la entrada del ADN de interés. Para realizar la selección de las colonias, se cultivan las células en placas de Petri con el antibiótico pertinente, puesto que sólo crecerán aquellas que hayan incorporado el ADN exógeno que porta el gen de resistencia a dicho antibiótico.

Si ha tenido éxito el clonaje, para producir la proteína de interés, se utiliza esta vez un vector de expresión, que posee una región de control de expresión, al que se le introduce el inserto.

2.3- Biomateriales

Desde el punto de vista médico, y de la mano de la química, siempre han tenido importancia los biomateriales, aquellos que se diseñan para estar en contacto con tejidos, órganos y seres vivos con diferentes fines terapéuticos³. También se han definido como sustancias que se encuentran en sistemas o dispositivos terapéuticos o de diagnóstico, diferentes a alimentos o fármacos, o materiales de origen biológico independientemente de su aplicación. A lo largo de la historia se han empleado una gran cantidad de materiales para este fin, tales como el oro en odontología o los clásicos ojos de cristal⁴.

Una característica crucial de los biomateriales es su compatibilidad asociada a la interacción del material con los tejidos del organismo. Una gran cantidad de compuestos poseen productos de degradación que serían altamente nocivos para dichos tejidos o que podrían generar una alta respuesta inmune en los organismos en cuestión. Por dichos motivos, interesan aquellos biomateriales que se encuentran basados en polímeros naturales, tales como lípidos, polisacáridos o proteínas, que salvan estos inconvenientes al ser sus monómeros totalmente compatibles, sin ocasionar daños a las células ni tejidos con los que está en contacto ni interfiriendo con el resto de funciones fisiológicas del hospedador, como es el sistema inmune

del mismo. Dentro de dicho grupo, son de especial interés los proteicos (Figura 4) puesto que sus métodos de extracción, purificación y caracterización están más estudiados⁵.

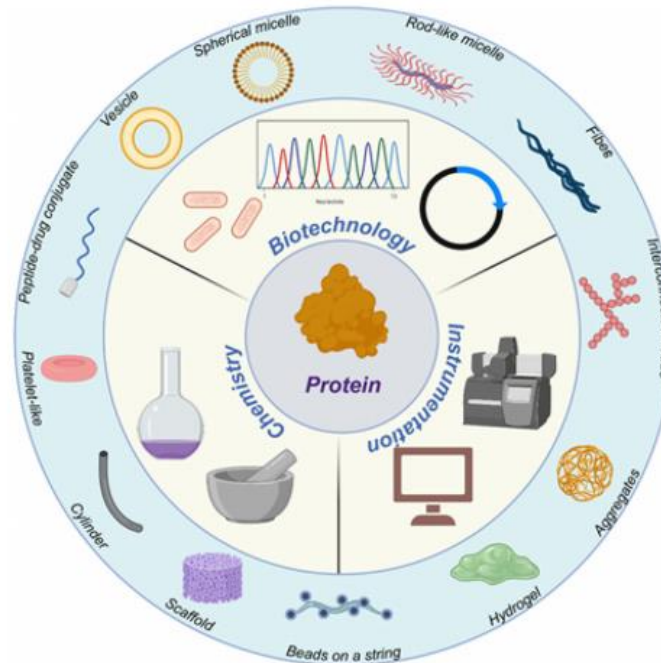


Figura 4. Esquema de diferentes estructuras de un biomaterial proteico⁵.

En lugar de recurrir a la síntesis química para producir un polímero de interés, un método más eficaz es la utilización de los organismos vivos para su bioproducción, aprovechando sus herramientas celulares únicamente modificando su estructura genómica al introducir los genes de interés que codificarán para la proteína en cuestión. Por su fácil nivel de uso y los buenos resultados reportados, es común el uso de microorganismos, en concreto de cepas bacterianas de *Escherichia coli*, mediante el uso de las técnicas de ingeniería genética anteriormente mencionadas.

2.4- Sistemas de dosificación de fármacos

Los fármacos deben atravesar una multitud de obstáculos para que puedan hacer efecto en su diana terapéutica, que van desde su propia insolubilidad en la sangre y su posibilidad de agregación (como los compuestos hidrofóbicos), su degradación y su eliminación vía los riñones (que puede comprometer su vida media en el interior del organismo) hasta las barreras de permeabilidad, tales como las formadas por capas de células endoteliales en los vasos sanguíneos, o todavía mucho más densas, como es el caso de la barrera hematoencefálica. Todo ello puede comprometer la penetración del fármaco en los distintos tejidos del cuerpo, sumado a los efectos secundarios derivados de una toxicidad indeseada inherente al propio compuesto. Para poder transportar el fármaco por el organismo y evitar los inconvenientes anteriormente mencionados, se crearon los sistemas de dosificación de fármacos (Figura 5)⁵.

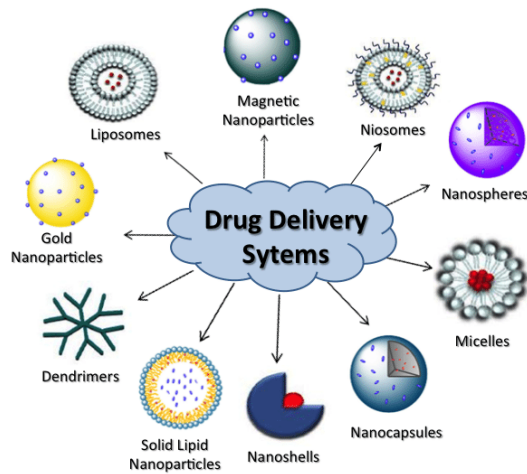


Figura 5. Diferentes tipos de sistemas de dosificación de fármacos⁵.

Los sistemas de dosificación de fármacos son estructuras de diversos tipos que se utilizan a modo de vehículo, siendo de especial interés los biomateriales debido a su compatibilidad con los seres vivos y por su facilidad de edición gracias a la tecnología del ADN recombinante, pudiendo alterar sus propiedades a voluntad de diseño. De entre todos ellos, y por sus propiedades biomédicas y fisicoquímicas, interesan aquellos que tratan de mimetizar el comportamiento de la proteína elastina, ya que, de entre todas sus cualidades, permiten la obtención de un gran abanico de conformaciones en función de la aplicación que queramos desarrollar: desde hidrogeles, micelas, vesículas hasta nanopartículas.

2.4.1- Elastina y polipéptidos tipo elastina

La elastina es una proteína que se encuentra en todos los vertebrados en la matriz extracelular, así como en los tejidos conectivos del organismo y otros como el pulmonar, la piel, los ligamentos y otro tipo de estructuras donde se requiera de elasticidad y resistencia. La elastina es hidrofóbica e insoluble en agua cuando adquiere su forma fibrilar, pero su precursor lineal, la tropoelastina, está compuesto por un bloque hidrofílico y otro hidrofóbico, siendo soluble en agua. La formación de las fibras de elastina tiene lugar a través del entrecruzamiento de sus residuos de lisina, alternando su conformación entre una forma relajada y la forma contraída.

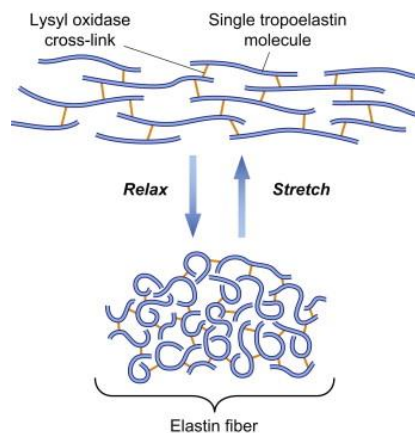


Figura 6. Formación de las fibras de elastina⁶.

Los polipéptidos tipo elastina (*elastin like polypeptides*, ELPs) son aquellos que imitan la secuencia consenso de la tropoelastina, que consiste en un pentapéptido (VPGXG)_n, donde n es el número de repeticiones del bloque y X se conoce como el “aminoácido huésped”, que puede ser cualquiera excepto la prolina. Dicho aminoácido define, entre otras características, la hidrofobicidad del bloque formado, la arquitectura final del polipéptido y su propiedad más importante: la temperatura de transición (T_t), condicionada por la energía libre de Gibbs (Ecuación 1), relacionando dicha energía (ΔG) con la entalpía (ΔH) y la entropía (ΔS) a través de la temperatura (T).

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Ecuación 1}$$

Los ELPs son solubles en agua por debajo de su T_t debido a que poseen distintas interacciones favorables con la misma, como enlaces de hidrógeno o interacciones electrostáticas, que provocan su disolución gracias a que generan una entalpía negativa por hidratación hidrófoba, caracterizada por moléculas de agua con estructuras tipo clatrato que rodean los grupos apolares del polímero (Figura 7). Una estructura tipo clatrato se da cuando un determinado compuesto se ordena generando una red con cavidades con la capacidad de retener en su interior a otros tipos de moléculas con las que interactúa⁷.

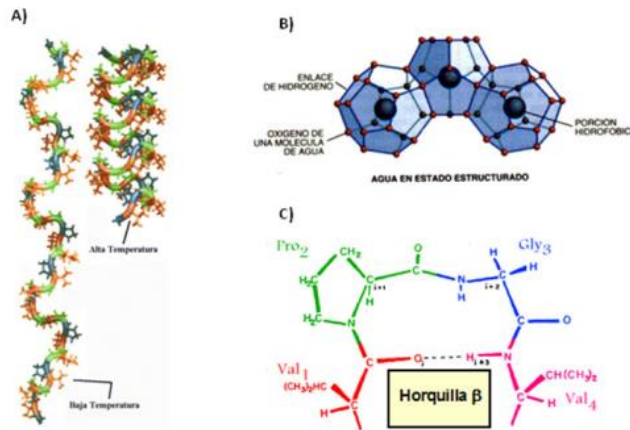


Figura 7. A) Contracción hidrófoba del polímero al aumentar la temperatura. B) Estructura de los clatratos que provocan la solubilización de los ELPs a temperaturas inferiores a su T_t. C) Forma de la espiral β adoptada en el ordenamiento hidrófobo de los ELPs⁷.

Por otro lado, el ordenamiento de las moléculas de agua alrededor del polímero proporciona una entropía negativa, lo cual indica que habrá una temperatura (T_t) a la cual el término entrópico supere al de la entalpía, la agitación térmica destruya las asociaciones anteriormente mencionadas y, por lo tanto, el polímero deje de ser soluble en el agua, formándose agregados, nanopartículas o hidrogeles con estructuras regulares de espiral β de por efecto hidrófobo. Aunque se genere un ordenamiento en la estructura del polímero debido a su interacción hidrófoba, el desorden producido por la ruptura de los clatratos y la liberación de las moléculas de agua obtenidas provocan que el balance global proporcione ΔG < 0, implicando que el polipéptido deje de ser soluble en el agua y precipite.

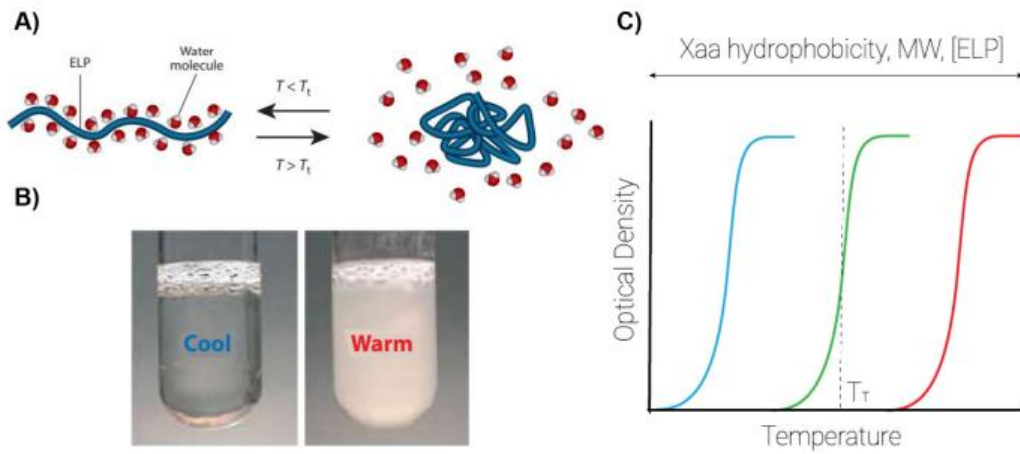


Figura 8. A) Ilustración de cómo el polipéptido se libera de las moléculas de agua al superar la temperatura de transición. B) Fotografía del polipéptido, disuelto en frío y precipitado en caliente. C) Gráfica para obtener la temperatura de transición a través de la absorbancia⁵.

El valor de T_t se determina fácilmente siguiendo la absorbancia frente a la temperatura, siendo el punto de inflexión de la curva obtenida, que viene definido por la longitud del bloque, la hidrofobicidad de los mismos, el orden de los aminoácidos o si lleva un fármaco unido, entre otros.

Esto define un método de purificación alternativo a la cromatografía clásica, denominado “ciclos de transición inversa” (*inverse transition cycling, ITC*). Mediante dicho método al calentarse la disolución el ELP precipitará, y tras separarlo por centrifugación, podemos desechar el sobrenadante y resuspenderlo, esta vez en frío, para que se disuelva y que, por acción de otra centrifuga, separar precipitado y sobrenadante, siendo este último el que interesa ahora, repitiendo el ciclo (Figura 9).

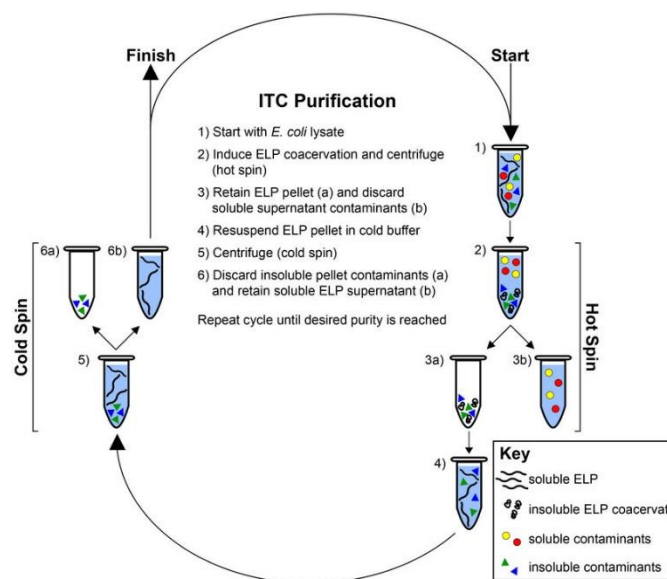


Figura 9. Esquema genérico del ITC⁸.

2.4.2- Nanopartículas basadas en ELPs

Mencionado anteriormente, la T_t de un bloque de ELP viene definida por la hidrofobicidad del aminoácido huésped que lo componga. De acuerdo a esto, a mayor carácter hidrofóbico, menor

cantidad de moléculas de agua podrán interactuar con esa secuencia y, por lo tanto, menor será la T_t del polímero de interés⁹. Así, cuando un ELP se construye con un bloque hidrófobo y otro hidrofílico (un polipéptido anfifílico), se producirá un autoensamblaje del mismo cuando se alcance la temperatura crítica de micelización (CMT), que viene definida por la T_t de cada bloque y la influencia de los mismos entre sí. La parte hidrofóbica quedará enterrada en el interior de la estructura mientras que la hidrofílica permanecerá en la superficie, en contacto con el agua, formando nanopartículas (Figura 10). La concentración a la que esto ocurre se denomina concentración crítica de micelización (CMC)⁵.

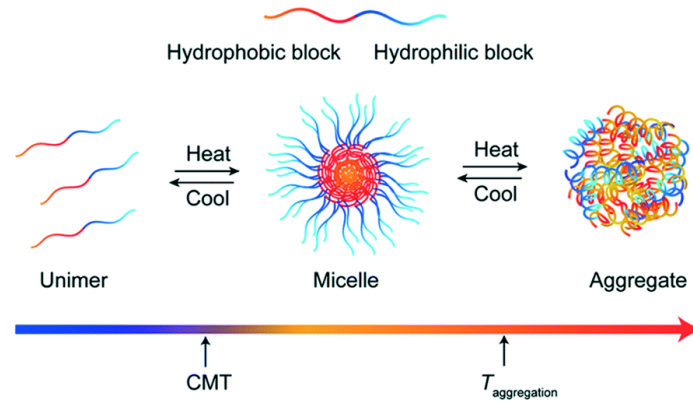


Figura 10. Formación de nanopartículas y agregados al aumentar la temperatura del polipéptido lineal disuelto¹⁰.

Esto les confiere un notorio valor como sistemas de dosificación de fármacos, puesto que medicamentos hidrofóbicos que se transportan mal por el torrente sanguíneo quedarían encapsulados en el núcleo hidrofóbico y, como la nanopartícula es soluble por sus segmentos hidrofílicos, se mejoraría extraordinariamente el alcance de su diana terapéutica y su transporte y accesibilidad.

3- Objetivos

Por lo anteriormente expuesto, resulta evidente el interés en la obtención de polipéptidos tipo elastina desde el punto de vista biomédico como nuevos sistemas con gran potencial en la dosificación de fármacos, gracias a su biocompatibilidad y a su degradación de manera no tóxica y sin efectos secundarios, debido a que imitan la secuencia de la elastina natural.

En esta línea, este trabajo se focalizó en producir y purificar dos polímeros tipo elastina basados en serinas e isoleucinas, el $(SI)_2$ y el $3CK_{24}(SI)_2$. El $(SI)_2$ poseería una carga superficial neutra debido a que dichos aminoácidos no poseen grupos cargados, mientras que el $3CK_{24}(SI)_2$, debido a su bloque de lisinas, debería ser catiónico en condiciones fisiológicas. Una vez puesta a punto su purificación se caracterizarán y se evaluará la capacidad de cada uno para la formación de nanopartículas.

A su vez, se pretende probar un método de purificación alternativo empleando un polímero muy utilizado en el grupo de investigación, el $3K(EI)_2$, con el objetivo de disminuir el tiempo que conlleva el método tradicional mediante ciclos de transición inversa (ITC).

Por tanto, los objetivos marcados a corto plazo fueron los siguientes:

1. Mediante el uso de las técnicas y métodos de ingeniería genética, unir los insertos génicos que codifican para el $(SI)_2$ y $3CK_{24}(SI)_2$ a los vectores adecuados de clonación (para amplificar sus cantidades) y expresión (para producir las proteínas recombinantes), mediante el uso de técnicas y métodos de la ingeniería genética. Esto se realizará en distintas cepas de *E. coli*.
2. Confirmar, mediante técnicas de biología molecular, la correcta secuencia de los plásmidos sintetizados.
3. Producir ambos polímeros a media escala una vez que se haya comprobado, mediante técnicas como la electroforesis, que a pequeña escala las bacterias son capaces de generar la proteína de manera eficiente.
4. Purificar los polímeros basados en serinas e isoleucinas mediante ITC, además de poner a punto de un nuevo protocolo de purificación alternativo con un polímero altamente estudiado en el grupo de investigación.
5. Caracterizar a través de distintas técnicas sus propiedades fisicoquímicas y su capacidad para la formación de nanoestructuras. Para ello, se emplearán técnicas tales como: SDS-PAGE, MALDI-TOF, 1H -RMN, DLS o análisis de aminoácidos por HPLC.

4- Materiales y métodos

4.1- Materiales

4.1.1- Reactivos químicos

A continuación, se expone un listado de los productos químicos utilizados ordenados alfabéticamente (Tabla 1):

Reactivo	Casa comercial	Reactivo	Casa comercial
Acetonitrilo 99% (MeCN)	Fisher	Glicerol 99%	Thermofisher
Ácido acético >99% (HAcO)	Thermofisher	Glicina	Sigma-Aldrich
Ácido clorhídrico 37% (HCl)	Thermofisher	Glucosa	Merck
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	Formedium	Hidróxido sódico (NaOH)	Thermofisher
Acrilamida (Bisacrilamida) 40%	VWR	Isopropanol >99% (iPr-OH)	Thermofisher
Agarosa Seakem	Lonza	Kanamicina	Formedium
Ampicilina	Formedium	Marcador de ADN NZY Ladder III	NZYTech
Azul de bromofenol	Alfa Aesar	Marcador <i>Unstained Protein Molecular Weight Marker</i>	Thermo Scientific
β -Mercaptoetanol 99%	GIBCO	Marcador <i>NZYBlue Protein Marker</i>	NZYTech
Cloruro de cobre (CuCl ₂)	Acro	Metanol >99% (MeOH)	Thermofisher
Cloruro de sodio (NaCl)	Formedium	Persulfato amónico (PSA) >98%	Thermofisher
Dodecilsulfato sódico (SDS)	Formedium	SimplySafe™	EURx
Etanol >99% (EtOH)	Panreac	Tetrametilendiamina (TEMED) 99%	Thermofisher
Fluoruro de fenilsulfonilmetano 99% (PMSF)	Apollo Scientific	Tris (hidroximetil) aminometano (Tris base)	Sigma-Aldrich

Tabla 1. Resumen de los reactivos químicos utilizados.

4.1.2- Soluciones tamponadas

Un tampón (o *buffer*) es una disolución que se encarga de mantener el pH entorno a un valor preciso, siendo imprescindible que, en algunos tipos de técnicas o tratamientos, no se presenten fluctuaciones del mismo. Las disoluciones tampón utilizadas son las siguientes (Tabla 2):

Tampón	Composición
Loading Buffer Electroforesis de ADN 5x	Glicerol 30%, SDS 0,1%, azul de bromofenol 0,05%, Tris 50 mM pH8, EDTA 0,5 mM
Loading Buffer Electroforesis de Proteínas 5x	Tris-base 25mM pH 8.3, Glicina 192mM, SDS 0,1% (p/v), β -mercaptoetanol 1%
Buffer de sonicación 1x	Tris-base 20mM pH 8, EDTA 1 mM, PMSF 1mM
Buffer Tris-acetato-EDTA (TAE) 1x	EDTA 1 mM, Tris-acetato 40mM pH 8
Buffer de lavado celular 20x	NaCl 2,00 M, Tris-base 0,200 M pH 7,5
Running Buffer 5x	Glicina 0,959 M, Tris-base 0,124 M, SDS 17,3 mM
Buffer fosfato salino (PBS) 1x	NaH ₂ PO ₄ 5 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4

Tabla 2. Disoluciones tampón. Los términos "5x" o similares indican que se encuentra cinco veces más concentrado que su solución final, aplicando la dilución pertinente.

4.1.3- Materiales para biología molecular

4.1.3.1- Cepas bacterianas

Tanto para la clonación como para la expresión de los genes de interés, se utilizaron diferentes cepas de *E. coli*:

- **DH5 α Competent Cells (Nzytech)**: bacterias usadas como sistema de subclonaje del plásmido pET7(SI)₂ y el pET10NKKK(EI)₂ obtenidos mediante ligación previa. Su eficacia de transformación, o nivel de competencia, es de $\geq 10^6$ cfu/ μ g, donde cfu significa unidad formadora de colonias y hace referencia al rendimiento de las células en cuanto al proceso de transformación se refiere. A mayor eficacia de transformación, más bacterias internalizan el plásmido con la resistencia a antibiótico y, por lo tanto, más colonias crecen en el medio de cultivo con dicho antibiótico.
- **BLR(DE3) Competent Cells (Novagen)**: sistema de expresión para la producción de la proteína recombinante (SI)₂ del plásmido anteriormente amplificado. Su nivel de competencia es de $> 2 \times 10^6$ cfu/ μ g. Se trata de células competentes preparadas para la introducción de ADN exógeno mediante choque térmico.
- **SHuffle® T7 Express Competent E. Coli (NEB)**: sistema de expresión utilizado para obtener el polipéptido tipo elastina 3CK₂₄(SI)₂ a partir del vector pET10NCCCK₂₄(SI)₂. Su nivel de competencia es de 10^7 cfu/ μ g.

4.1.3.2- Medios de cultivo

Tanto para el crecimiento bacteriano como la expresión de proteínas, las bacterias necesitan unos medios de cultivo específicos, en función del objetivo buscado, que difieren notablemente en su composición, diferenciándose:

- **Lysogeny Broth (caldo de lisogenia, LB) (Formedium)**: medio de cultivo en el que se favorece el crecimiento de las bacterias en lugar de la expresión proteica. Se compone de 10 g/L triptona, 10 g/L NaCl y 5 g/L extracto de levadura (25 g/L).
- **LB 2X (Formedium)**: similar al anterior, pero doblemente enriquecido en nutrientes para mejorar el cultivo: 20 g/L triptona, 20 g/L NaCl y 15 g/L extracto de levadura (55 g/L)
- **Modified Terrific Broth (mTB o TB modificado)**: utilizado para la producción de proteína debido a su contenido en lactosa, lo cual promueve la autoinducción, además de para la generación previa de biomasa. Se compone de 12 g/L triptona, 24 g/L extracto de levadura, 4 mL glicerol/L medio, 3,3 g/L (NH₄)₂ SO₄, 6,8 g/L KH₂PO₄, 7,1 g/L Na₂HPO₄, 0,5 g/L glucosa, 2,0 g/L lactosa, 0,15 g/L MgSO₄ (55,85 g/L).
- **LB Autoinductor (Formedium)**: medio que, además del crecimiento, también promueve la inducción de la expresión proteica. Su composición es similar al LB normal, salvo que posee distintas sales fosfato, además de lactosa, presente también en el TB, que induce la expresión. Se compone de 10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura, 3,3 g/L (NH₄)₂ SO₄, 6,8 g/L KH₂PO₄, 7,1 g/L Na₂HPO₄, 0,5 g/L glucosa, 2,0 g/L lactosa, 0,15 g/L MgSO₄ (34,85 g/L).

- **LB-Agar (Formedium):** medio en estado sólido con el cual se recubren las placas Petri para el cultivo bacteriano. Normalmente requiere ser suplementado con un antibiótico, en concentración 1 µL/mL de medio. Se prepara con 25 g/L LB y 15 g/L agar.

Para asegurar que no se produce ningún tipo de contaminación en su preparación, todos los medios se esterilizan en botellas de vidrio con autoclave a 121°C durante 21 min.

- **Medio de caldo superóptimo con represión por catabolito (S.O.C. Medium) (Fisher):** utilizado para obtener transformaciones de máximo rendimiento. Se compone de 2% triptona, 0,5% extracto de levadura, 10mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucosa.

4.1.3.3- Enzimas de restricción y ligasa

Las enzimas de restricción son nucleasas de tipo endonucleasa, es decir, cortan el ADN de doble cadena cuando identifican un patrón interno concreto de bases nitrogenadas, o lo que se conoce como secuencia de restricción. El objetivo de su utilización fue extraer el inserto del vector de clonación (realizado anteriormente por el grupo de investigación) y comprobar que se había producido correctamente la ligación entre el vector de expresión y dicho inserto, que se expondrán más adelante. A continuación, se exponen las enzimas de restricción utilizadas junto con la secuencia diana que reconocen (Tabla 3):

Enzima de restricción	Secuencia diana
EcoRI	5'...G↓A A T T C...3' 3'...C T T A A↑G...5'
XbaI	5'...T↓C T A G A...3' 3'...A G A T C↑T...5'
NdeI	5'...C A↓T A T G...3' 3'...G T A T↑A C...5'

Tabla 3. Enzimas de restricción utilizadas y sus correspondientes secuencias de restricción.

Todas se emplearon siguiendo los protocolos y los *buffers* de la casa comercial (Thermofisher). En este caso era el tampón empleado fue el denominado *GreenBuffer 5x*, de la misma casa comercial. Como se aprecia en los cortes, todas estas enzimas generan extremos cohesivos. De encontrarse una única secuencia de restricción en un vector de clonación, se produciría su linealización y, en presencia de un inserto génico digerido con una enzima que genere extremos cohesivos complementarios, la unión de los mismos. Dicho proceso, conocido como reacción de ligación, requiere de la presencia de otra enzima, la T4 ADN Ligasa.

La T4 ADN Ligasa (Thermofisher), que debe su nombre al bacteriófago T4, de donde fue obtenida inicialmente, es una enzima que se encarga de la unión de fragmentos lineales de ADN cuyos extremos sean compatibles, catalizando la formación del enlace fosfodiéster. La casa comercial también proporciona su correspondiente tampón, el *T4 Buffer DNA Ligase 10x*.

4.1.3.4- Vectores plasmídicos

Los vectores se clasifican en función de su uso. Pueden ser: de clonación, para generar muchas copias de un gen, o de expresión, si interesa producir la proteína que codifica. En este caso, el trabajo se basó en el uso de vectores de expresión, siendo estos el pET7, el pET10NCCC y el pET10NKKK.

- **pET7 (p7):** vector de expresión de 5546 pb con secuencias que codifican resistencia al antibiótico Ampicilina y que fue obtenido a partir de la modificación del vector comercial pET-25b(+) (Novagen) por la Dra. Alessandra Girotti (Figura 11)¹¹.

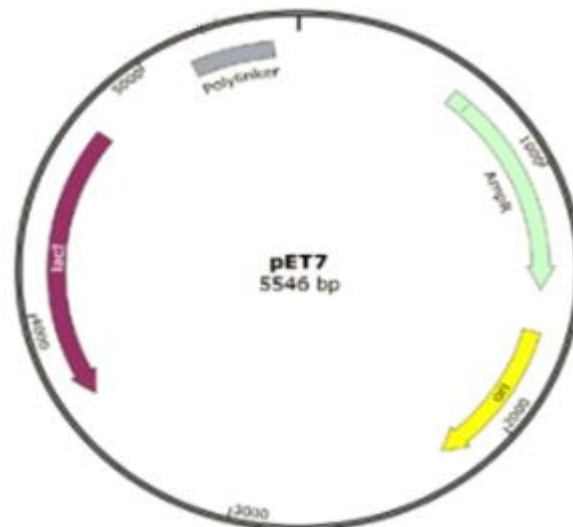


Figura 11. Representación del vector pET7.

- **pET10NCCC (p10N3C):** vector de expresión derivado del pET10 de 4520 pb con resistencia a Kanamicina, que añade tres cisteínas al extremo N-terminal de la secuencia del inserto añadida en la ligación (Figura 12).

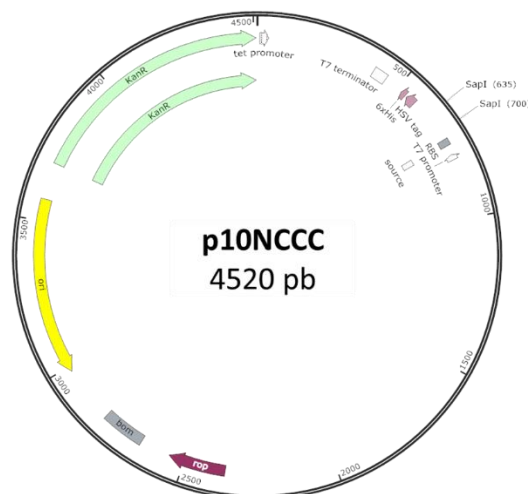


Figura 12. Esquema del pET10NCCC.

- **pET10NKKK (p10N3K):** vector de expresión derivado del pET10 de 4520 pb con resistencia a Kanamicina, que añade tres lisinas al extremo N-terminal de la secuencia del inserto añadida en la ligación (Figura 13).



Figura 13. Esquema del pET10NKKK.

4.1.3.5- Genes sintéticos y plásmidos base

El trabajo realizado se inició a partir de los fragmentos génicos (SI)₂, 3K(EI)₂ y el plásmido de expresión p10N3CK₂₄(SI)₂, ya desarrollados por el Grupo de Biodispositivos Avanzados para Nanomedicina de la Universidad de Valladolid (UVa).

- **(SI)₂:** es un inserto génico que codifica para uno de nuestros polímeros tipo elastina de interés. Posee un tamaño de 3300 pb y conforma un tetrabloque (Figura 14) formado a partir del dibloque S₅₀I₆₀, es decir, 50 repeticiones de la secuencia que codifica para el pentapéptido (VPGSG), con serina como aminoácido huésped, y por tanto de naturaleza hidrofílica; y 60 repeticiones de la secuencia codificante del bloque peptídico (VGIPG), de naturaleza hidrofóbica al poseer isoleucina como aminoácido huésped. Este tetrabloque fue introducido en el vector de expresión pET7, formando el p7(SI)₂, para posteriormente realizar un subclonaje y la producción de la proteína recombinante.



Figura 14. Esquema del (SI)₂, indicando los pentapéptidos formados por cada bloque. En naranja, hidrofóbicos y en azul, hidrofílicos¹².

- **p10N3CK₂₄(SI)₂:** vector de expresión diseñado para añadir tres cisteínas al N-terminal de la proteína expresada. Lleva incorporado el inserto de interés, K₂₄(SI)₂, que es similar al anterior salvo que incluye 24 repeticiones de la secuencia que conforma el pentapéptido (VPGKG), con lisinas, en su N-terminal y a continuación de las cisteínas. Tiene un tamaño de 3660 pb (Figura 15).



Figura 15. Esquema del 3CK₂₄(SI)₂, indicando la cola de cisteínas introducidas por el vector de expresión¹².

- **3K(EI)₂**: inserto de 3309 pb que codifica para un polímero compuesto por tres lisinas seguidas de un tetrabloque compuesto por un dibloque de [(VPGVG)₂(VPGEG)(VPGVG)₂]₁₀, cuyo aminoácido huésped es el glutámico, y de (VGIPG)₆₀ análogo al anterior. El hecho de que haya cuatro pentapéptidos (VPGVG) flanqueando al del glutámico tiene como misión la reducción del carácter hidrofílico de ese bloque, facilitando, la purificación del mismo al disminuir su temperatura de transición. Este inserto fue ligado al vector de expresión p10N3K (Figura 16).

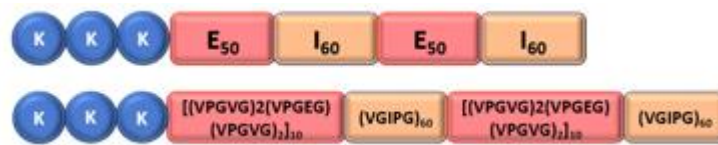


Figura 16. Esquema del 3K(EI)₂, indicando la cola de lisinas introducida por el vector de expresión.

4.1.3.6- Kits de extracción y purificación de ADN

Para identificar qué colonias de subclonaje han introducido el plásmido buscado, es necesario extraerlo del interior de las bacterias y purificarlo. Para ello, se utilizó el *NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid) Mini kit for plasmid DNA purification* (Macherey-Nagel) para la obtención de pequeñas cantidades de ADN a partir de cultivos bacterianos de poco volumen (5-10 mL).

4.2- Métodos

4.2.1- Reacción de ligación

La reacción de ligación consiste en la introducción de ADN exógeno, denominado inserto, a un vector. Ambos componentes deben tener extremos complementarios y, por lo tanto, requiere que reciban la digestión enzimática por parte de enzimas de restricción que generen dichos extremos compatibles (Figura 3 y Figura 17).

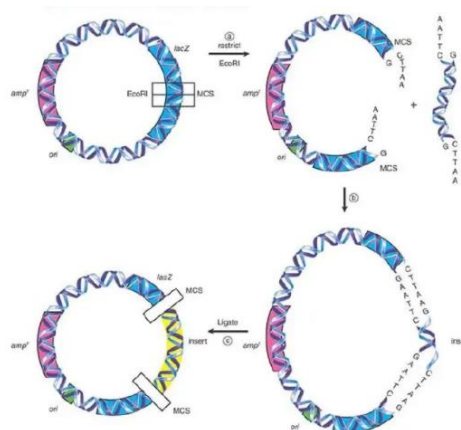


Figura 17. Reacción de ligación, donde se ve que el inserto (en verde) es compatible con los extremos generados².

Para ello, se utiliza la T4 ADN Ligasa, que actúa junto a su *T4 Buffer DNA Ligase 10x* suministrado por la misma casa comercial. El procedimiento consiste en mezclar los componentes de la reacción junto con el buffer y la enzima y dejar la mezcla a temperatura ambiente durante una hora o a 4°C durante tres días. El ADN recombinante (rADN) resultante de la ligación debe ser conservado a -20°C.

4.2.2- Preparación de placas de cultivo bacteriano

La preparación de placas de Petri para el cultivo de colonias requiere realizar la mezcla LB-Agar anteriormente mencionada (*apartado 4.1.3.2*), disolviéndola y esterilizándola a 121°C durante 21 min. Después, se vierte en campana estéril sobre las placas de Petri una cantidad aproximada a 30 mL y se dejan solidificar. En el caso de que se requiera la suplementación con un antibiótico adecuado, este debe ser diluido en el medio de forma que su concentración final sea 1 µL Antibiótico/mL de LB-Agar.

4.2.3- Transformación en cepas bacterianas

Para seguir con el proceso de clonaje, necesitamos introducir el rADN en la célula anfitriona, la cual se va a encargar de generar múltiples copias del plásmido introducido y que lleva nuestro gen de interés. Este proceso de incorporación de ADN exógeno por parte de la bacteria se denomina transformación. Aunque se han utilizado diferentes cepas bacterianas, todas previamente almacenadas a -80°C, el proceso de transformación posee un punto común en todas ellas, el método de introducción de ADN, ya que las células utilizadas han recibido numerosos tratamientos fisicoquímicos para inducirles el estado de competencia. Este estado, que es natural en muchos tipos de bacterias, se alcanza cuando, al estar el medio que las rodeas en unas condiciones determinadas, son capaces de abrir poros en su membrana y captar ADN externo. En la práctica, se consigue dejándolas incubar en hielo un tiempo determinado (depende de la cepa) y posteriormente realizar un choque térmico a 42°C durante unos pocos segundos de manera exacta, tal y como indica el protocolo de la casa comercial. Durante ese choque térmico es cuando captan el rADN.

4.2.3.1- Transformación en *DH5α Competent Cells*

Células utilizadas para clonaje de rADN. Se saca una alícuota de bacterias y se coloca en hielo para que descongele lentamente. En un tubo de 14 mL, se pipetea 50 µL de las células, sobre los cuales se añaden 5 µL del rADN que se quiere incorporar y se deja incubando en hielo durante 30 min. Pasado ese tiempo se realiza un choque térmico de 30 s a 42°C y se colocan de nuevo en el hielo durante 2 min para que vuelvan a cerrar sus poros. En ese momento se añaden 450 µL S.O.C. Medium y se incuban durante 1 h a 37°C y 250 rpm en un incubador con agitación. El tubo deber permitir la renovación del flujo de aire de su interior. De la transformación obtenida se siembran 60 µL y 120 µL en dos placas de Petri, preparadas y atemperadas anteriormente, que contengan el antibiótico adecuado, y se dejan crecer durante 16 h a 37°C en una estufa.

4.2.3.2- Transformación en *BLR (DE3) Competent Cells*

Una vez se consigue la clonación del plásmido deseado, este se transfiere a una cepa que favorezca la expresión de la proteína recombinante. El protocolo a seguir es parecido al anterior, salvo que se utilizan 20 μL de bacterias, 1 μL de rADN, 80 μL S.O.C. Medium y la incubación en hielo dura 5 min. De la transformación resultante se siembran 20 μL , junto con una cama de 50 μL de S.O.C. Medium para favorecer su extensión por la placa, y 40 μL en dos placas diferentes que se incuban durante 16 h a 37°C.

4.2.3.3- Transformación en *SHuffle® T7 Express Competent E. coli*

Cepa de expresión con un protocolo de transformación análogo al de DH5 α (apartado 4.2.3.1), salvo que la cantidad de S.O.C. Medium utilizada es de 950 μL . De la transformación, se siembran dos placas con antibiótico, una con 75 μL y otra dividida en dos mitades: una con 20 μL y la otra con una dilución 1:10 de S.O.C. Medium de otros 20 μL .

4.2.4- Purificación de ADN plasmídico de *E. coli*.

Para comprobar que el vector y el inserto se han unido correctamente, es necesario extraer y purificar el material genético de la bacteria para su posterior uso en la síntesis del ELP. Para ello se siguió el protocolo de purificación anteriormente mencionado (apartado 4.1.3.6). Hay dos protocolos a seguir con el *NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid) Mini kit for plasmid DNA purification*: uno para vectores de expresión, denominados “*low-copy*”, y otro para vectores de clonación, también conocidos como “*high-copy*” (Figura 18). La diferencia entre ambos radica en la cantidad de biomasa producida, siendo mayor la de los vectores *high-copy* que los *low-copy*, necesitando mayor cantidad de volumen de cultivo en el segundo caso para alcanzar la cantidad óptima de biomasa, siendo de 5 mL de LB + 5 μL del antibiótico correspondiente para el *high-copy* (puesto que el plásmido está diseñado para obtener un alto número de copias) y de 10 mL de LB + 10 μL del antibiótico para el *low-copy* (diseñado para plásmidos de expresión, cuya replicación es menor). Al emplearse diferentes volúmenes de cultivo también se modifican las cantidades de reactivo posteriormente utilizadas. En este caso, como se trabajaron vectores de expresión, se siguió el protocolo *low-copy*.

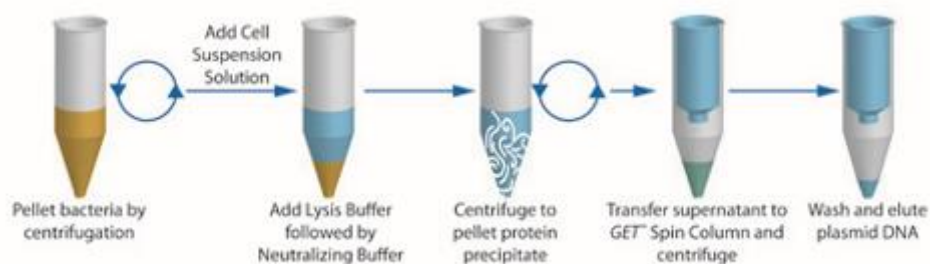


Figura 18. Resumen del protocolo de extracción y purificación de ADN plasmídico¹³.

El cultivo se centrifuga para separar el medio de cultivo del pellet bacteriano, descartando el sobrenadante. A continuación, se añade el tampón de resuspensión, que posee RNasa para eliminar las posibles moléculas de ARN que puedan contaminar el ADN plasmídico. Se centrifuga,

se desecha el sobrenadante y se añade el tampón de lisado alcalino, compuesto por NaOH y dodecilsulfato sódico (SDS), un detergente aniónico, produciéndose la ruptura celular. El tampón de neutralización posteriormente añadido ajusta el pH.

Se somete la muestra a centrifugación para que los restos celulares se peguen en el fondo del tubo, y se recoge el sobrenadante para introducirlo en una columna de microextracción de fase sólida (SPME). La fase estacionaria del interior de la columna posee una gran afinidad por el ADN plasmídico mientras que posee poca o nula afinidad por el resto de compuestos presentes en el citoplasma bacteriano. Se centrifuga para que la muestra penetre en la columna y posteriormente se añade el tampón de lavado (precalentado a 50°C), que elimina los interferentes retenidos en la columna, dejando intacto el ADN, y se somete a otra centrifugación. Después, se añade el tampón de lavado concentrado, suplementado con etanol, que, al reducir la constante dieléctrica del medio, promueve la formación de enlaces iónicos entre el Na⁺ con los grupos PO₄³⁻ del esqueleto azúcar-fosfato del ADN, provocando que precipite. Se realiza una centrifuga para proceder al secado de la columna.

Finalmente, se añade el tampón de elución (calentado previamente a 70°C), para provocar la salida del ADN de la columna.

En este caso, la concentración y pureza de los plásmidos purificados se determinó con un espectrofotómetro UV-Vis *Nanodrop 2000c Spectrophotometer* (Thermo Scientific), cedido por el Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM) de Valladolid. Este instrumento permite calcular la concentración (C) del ADN presente en la muestra a partir de la ley de Lambert-Beer, relacionándola con la absorbancia (A) a 260 nm a través del coeficiente de absorción (a) y la longitud de la cubeta (l) utilizada (Ecuación 2):

$$A = a \cdot l \cdot C \quad \text{Ecuación 2}$$

Además, permite medir dos relaciones de absorbancias cuyos parámetros permiten evaluar la calidad y el grado de pureza del ADN: A260/A230, siendo a 230 nm la longitud de onda a la que absorben sales caotrópicas, fenoles o carbohidratos; y A260/A280, siendo a 280 nm a la que absorben las proteínas (Tabla 4).

Relación	Valor	Nivel de pureza
A260/A230	2.0-2.2	Pureza óptima.
	1.8-2.0	Pureza aceptable.
	1.5-1.8	ADN contaminado con sales caotrópicas, fenoles o carbohidratos.
	< 1.5	ADN altamente contaminado con sales caotrópicas, fenoles o carbohidratos.
A260/A280	> 2.1	ADN contaminado con ARN.
	1.8-2.1	Pureza óptima.
	1.6-1.8	Pureza aceptable.
	< 1.6	ADN contaminado con compuestos aromáticos.

Tabla 4. Nivel de pureza del DNA en función de la relación de absorbancias.

4.2.5- Digestión analítica de ADN con enzimas de restricción

Una vez conocida la concentración y calidad del ADN obtenido, se procede a evaluar si la ligación ha ocurrido de manera satisfactoria mediante un mapeo de restricción. Este mapeo del ADN consiste en cortar al mismo con enzimas de restricción endonucleasas y analizar los fragmentos de restricción, productos del corte, mediante una electroforesis de agarosa. Con estos podemos elucidar si nuestro inserto se ha introducido correctamente en el vector de expresión ya que, al conocer la secuencia del plásmido, se puede predecir dónde cortará cada enzima y cuáles serán los pesos de los fragmentos generados.

Las enzimas trabajan de manera óptima en unas condiciones de pH, temperatura y concentración muy específicas. Las enzimas utilizadas, *NdeI*, *XbaI* y *EcoRI* (estas últimas permiten la codigestión del ADN al funcionar en el mismo medio tamponado) siguiendo el protocolo aportado por la casa comercial de las mismas.

4.2.6- Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La electroforesis es un método utilizado para la separación de macromoléculas en función de su tamaño, carga y otras propiedades como su conformación. Las muestras deben situarse en un medio soporte para evitar perturbaciones mecánicas o corrientes de convección mientras dura la separación. Estos medios suelen ser polímeros o geles que forman una malla o matriz tridimensional por donde debe avanzar la muestra. La fricción que sufren al pasar por sus poros vuelve factores como el tamaño y la forma muy relevantes en la separación (Figura 19).

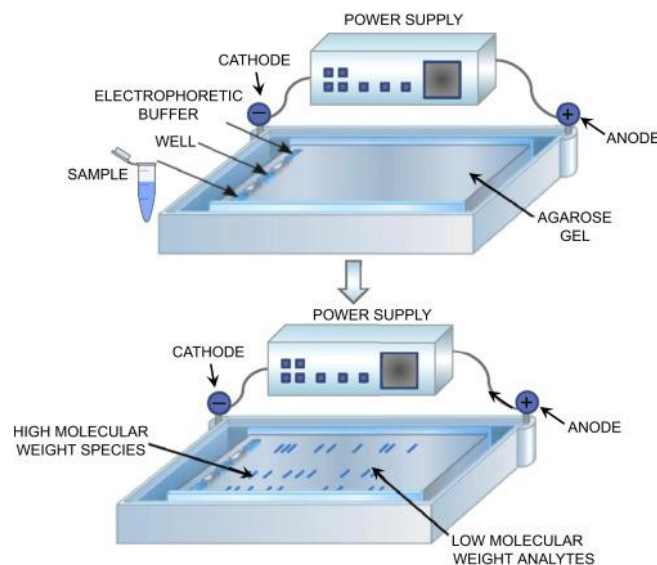


Figura 19. Esquema de una electroforesis de ADN¹⁴.

La fuerza impulsora de la separación es la diferencia de potencial aplicada a ambos extremos del gel. Cuando la muestra se mezcla con una solución tampón adecuada y queda embebida en el interior del gel, sumergido también en dicho tampón, este aplica una fuerza de fricción contraria al avance. Las macromoléculas alcanzan rápidamente una velocidad constante cuando se igualan las dos fuerzas, que dependen de la fuerza del campo, la porosidad de la matriz, la forma y tamaño de las muestras, la hidrofobicidad relativa de las mismas y la temperatura y fuerza iónica del

tampón, además de su viscosidad. Las muestras se separan de manera diferencial en el gel, que actúa de tamiz molecular, en función de sus movilidades electroforéticas, que dependen a su vez de la carga de la molécula (q) y de su coeficiente de fricción (f) (Ecuación 3):

$$M = \frac{q}{f} \quad \text{Ecuación 3}$$

La movilidad electroforética es un parámetro característico de las moléculas y depende del pK_a de sus grupos cargados. Para la separación de ácidos nucleicos, se utiliza la agarosa y de manera horizontal.

La agarosa es un polisacárido lineal que se encuentra en las algas y que se disuelve entre los 50-60°C. Su peso es de aproximadamente 12 kDa y está formada por la repetición de la agarobiosa, un disacárido formado por galactosa y 3,6-anhidrogalactosa. Al enfriarse, este polisacárido solidifica formando un gel, cuya matriz posee poros capaces de actuar como tamices moleculares y cuyos tamaños pueden ser controlados en función de la concentración de agarosa. Por este motivo, el porcentaje de agarosa de un gel define el intervalo de tamaños, en pares de bases, que es capaz de separar dicho gel en electroforesis (Tabla 5).

El medio tamponado es el *Buffer TAE 1x*, puesto que permite trabajar a pH 8, permitiendo que los grupos fosfato de las cadenas de ADN se encuentren cargados (ya que se desprotonan por encima de pH 7). Como las moléculas de ADN poseen carga negativa, estas migrarán del cátodo hacia el ánodo, a velocidades inversamente proporcionales al logaritmo en base 10 del número de pares de bases. Debido a que todos los fragmentos de ADN poseen la misma carga por masa la separación se debe exclusivamente al tamaño de las muestras.

Rango de tamaño (pb)	% (m/v) Agarosa en TAE 1x
1000-23000	0,60
800-10000	0,80
400-8000	1,00
300-7000	1,20
200-4000	1,50
100-3000	2,00

Tabla 5. Capacidad de separación del gel de Agarosa Seakem®, en función de su porcentaje en disolución.

Los geles se tiñen, en este caso, en TAE 1x con SimplySafe™, un agente intercalante de las bases nitrogenadas del ADN que emite fluorescencia, durante aproximadamente media hora tras ser irradiado con luz UV. Las fotos de las electroforesis de este trabajo fueron tomadas con un equipo *Gel Doc™ EZ Imager* (Bio-Rad).

De esta manera, se pueden evaluar los fragmentos de restricción e identificar el plásmido obtenido es el deseado, utilizando para ello como referencia una muestra de ADN con fragmentos totalmente conocidos según su tamaño en pb conocido como marcador (o *marker*). Por comparación con los mismos, podemos saber si el tamaño de nuestro ADN entra en el rango ofrecido por dicho marcador y conocer su peso (Figura 20).

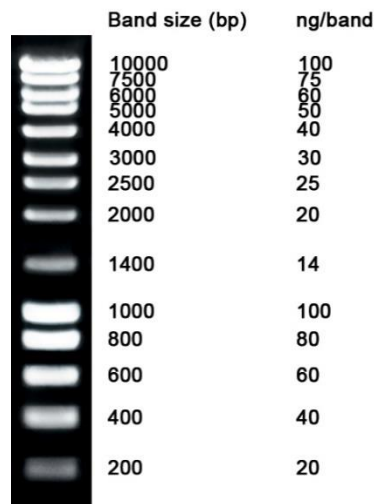


Figura 20. Imagen de las bandas proporcionadas por el DNA NZY Ladder III.

4.2.7- Secuenciación de ADN

La secuenciación es una técnica que permite obtener el orden de los monómeros que conforman un polímero, ya sean proteínas, ADN o ARN. La estrategia es análoga en los tres: primeramente, se fraccionan en secuencias más cortas que puedan ser secuenciadas para posteriormente repetir el procedimiento con otra técnica de corte que se solape con el primer punto de corte, y así obtener otra serie de fragmentos que permitan, por comparación, hallar el orden total de la macromolécula.

La secuenciación de ADN se realiza por el método de Sanger en el que, a partir de un ADN molde, se generan segmentos de distinta longitud a partir del mismo origen del molde, debido a que el último nucleótido incorporado es un didesoxinucleótido trifosfato (ddNTP) que lleva incorporado un agente fluorescente para poder ser detectado. La separación de esos fragmentos se lleva a cabo por electroforesis capilar. Esto fue realizado por Cenit Support Systems S.L., Parque Científico de Salamanca (Villamayor), con los cebadores (o *primers*) asociados a cada plásmido.

Conocer la secuencia de nucleótidos (y, por tanto, sus codones) permite conocer la proteína que se sintetizará a partir de la traducción de su hebra codificante.

4.2.8- Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

Una vez se tiene el plásmido obtenido, se transforma en cepas de expresión y se comprueba que son capaces de expresar la proteína recombinante de interés. Para ello se prepara un cultivo de las colonias seleccionadas en 5 mL de TB, para favorecer la expresión de proteínas, con una concentración final del 1x del antibiótico correspondiente, y se analizan las proteínas producidas por dichas colonias de bacterias mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).

El fundamento del SDS-PAGE es análogo a la electroforesis de DNA (*apartado 4.2.6*). En este caso, el gel es producto de la polimerización química de la acrilamida, cuyos monómeros producen cadenas lineales, y la bisacrilamida, que crea puntos de ramificación para poder obtener una matriz

tridimensional que actúe de tamiz molecular para separar a las proteínas de la muestra. La porosidad alcanzada en este tipo de geles es siempre menor a la de los geles de agarosa. El gel de acrilamida se prepara a partir de acrilamida, bisacrilamida, agua Milli-Q, Tris-HCl, $\text{NH}_4\text{S}_2\text{O}_8$ (APS) como agente iniciador generador de radicales libres, 10% SDS y tetrametiletilendiamina (TEMED) como catalizador (Figura 21). Además, la posición del gel es vertical.

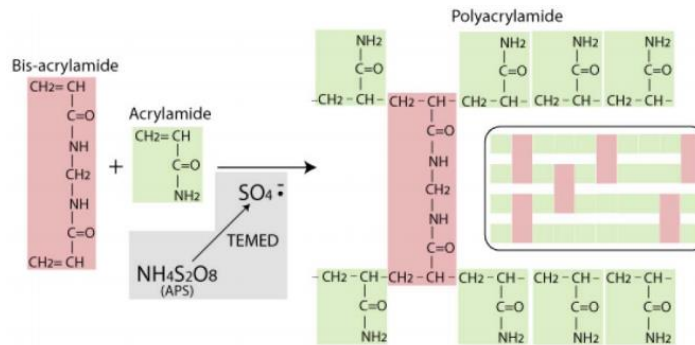


Figura 21. Esquema de la formación del gel de poliacrilamida¹⁵.

Se utiliza un sistema de Tris discontinuo. La primera parte del gel, denominada gel compactador o *stacking*, posee una menor concentración de acrilamida y, por lo tanto, poros más grandes además de un pH en torno a 6,8. A este valor de acidez los cloruros del tampón avanzan más rápidamente, elevando el pH detrás de ellos y creando una zona de baja conductividad. Esto provoca que la glicina presente en el tampón (*Running Buffer 1x*) se ionice parcialmente migrando detrás del frente del cloruro. Los péptidos migrarán entre ambas bandas, apilados y permitiendo que durante los primeros minutos de la electroforesis las proteínas entren concentradas.

La segunda parte del gel es el gel de resolución o *resolving*, el cual posee un pH alrededor de 8,8, provocando que la glicina se encuentre totalmente ionizada y supere a los péptidos. Al poseer una mayor cantidad de acrilamida, su porosidad es mayor y, por lo tanto, ejerce un efecto tamizador. Como esta parte posee SDS, un detergente aniónico que se une a cada aminoácido mediante dos moléculas, la carga por masa es equivalente a todas las proteínas, haciendo que la separación sea exclusivamente por el tamaño de las mismas.

El SDS-PAGE permite la caracterización de las proteínas cuando se emplea un marcador de referencia de proteínas con peso molecular conocido en paralelo a las muestras de estudio. Por comparación entre las bandas de la muestra y del marcador, se puede hallar, mediante una recta de calibrado previa, el peso molecular de la proteína de interés. Para ello hay que evaluar el factor de retraso (R_f) frente al logaritmo en base 10 de la masa molecular (Ecuación 4):

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida (cm)}}{\text{distancia del frente (cm)}} \quad \text{Ecuación 4}$$

Par analizar la producción proteica de los cultivos bacterianos mediante SDS-PAGE, se centrifuga el medio de cultivo para separarlo del pellet celular, del cual, tras sucesivos lavados con agua, se cogen 20 μL de una resuspensión de 200 μL y se tratan *Loading Buffer 5x* hasta que su concentración final sea del 1x. Las muestras se hierven durante 5 minutos a 95-100°C para

desnaturalizar las proteínas y se centrifugan durante 5 minutos. Como el tampón de carga posee β -mercaptoetanol, los puentes disulfuro de las proteínas son reducidos permitiendo la evaluación del peso molecular de las subunidades.

Las muestras cargadas en la electroforesis se normalizan a un volumen de 5 μ L y se las somete a un amperaje constante de 25 mA/gel durante aproximadamente 1 hora. Finalizado ese tiempo, se secciona el *stacking* y se tiñe en CuCl_2 0,3 M o azul de Coomassie, durante 10 minutos aproximadamente. Los geles teñidos con cobre se destiñen en agua destilada durante otros 10 minutos, mientras que los teñidos con Coomassie se destiñen en su propia disolución de desteñido, una mezcla de H_2O , MeOH y HAcO (de relación en volumen 50:40:10, respectivamente).

Al método de picar colonias en medio de expresión y posterior análisis de las proteínas producidas por SDS-PAGE se denomina *screening*. La colonia más productora del polímero será la que presente la banda correspondiente a la proteína de interés más ancha e intensa que el resto de proteínas endógenas de la bacteria (primer *screening*). Una vez elegida la colonia más productora, esta se vuelve a sembrar en otra placa, generando otras colonias hijas entre las cuales se volverá a elegir la más productora (segundo *screening*). Finalmente, se prepara el proceso de bioproducción de la proteína recombinante con cultivos a media escala.

4.2.9- Bioproducción de proteínas recombinantes

La producción se realiza en Erlenmeyer de 2 L, todos a 1/4 de su capacidad (500 mL) para favorecer la aireación de los mismos y permitir el crecimiento del cultivo. Para conseguir grandes cantidades de biomasa, en primer lugar, se prepara el preinóculo en un tubo Falcon de 50 mL que contenga 5 mL LB, antibiótico 1000x (siendo equivalente a 100 mg/mL de Ampicilina o 30 mg/mL de Kanamicina) a una concentración final del 1x, glucosa 20% hasta una concentración final del 1% y la colonia más productora elegida anteriormente por SDS-PAGE (conviene normalmente picar dos, por si alguna no creciera). El cultivo se incuba a 37°C y 250 rpm durante toda la noche.

Al día siguiente se prepara durante la mañana el inóculo. En un Erlenmeyer de 250 mL se añaden 30 mL de LB, antibiótico 1000x hasta el 1x, glucosa 20% hasta el 1% y 100 μ L de los preinóculos, dejándolos crecer durante toda la mañana. Se preparan los Erlenmeyer con el medio deseado para el cultivo (normalmente un total de 5-7 L de producción) y se les añade 1 mL del inóculo que mejor haya crecido en base a sus densidades ópticas a 600 nm (OD_{600}). Además, se añade a los medios antibiótico 1000x hasta el 1x y se deja creciendo a 37°C y 250 rpm durante toda la noche. En paralelo se coge 1 mL de los inóculos en dos tubos de 1,5 mL y se guardan a 4°C para ser analizados posteriormente. Además, se prepara un control con 5 mL de TB, antibiótico 1000x hasta el 1x y 1 mL del inóculo en un tubo Falcon 50.

En paralelo, se prepara un glicerol stock de la colonia más productora para conservarla congelada. Como las placas de Petri solo aguantan un mes a 4°C, se prepara una reserva de dicha colonia inmortalizada en glicerol, pudiendo volverse a sembrar en otra placa más adelante del propio glicerol stock. Para ello, en un tubo Falcon 50 se añaden 5 mL de LB, antibiótico 1000x hasta el 1x,

glucosa 20% hasta el 1% y 100 μL de los preinóculos, dejándolo crecer hasta que alcanza un valor de OD_{600} de 0,7-0,9, momento en el que el crecimiento de la bacteria es exponencial y está listo para ser almacenado. En un criovial se añaden 800 μL de dicho cultivo y 200 μL de glicerol estéril (autoclavado) al 80%, se agita por inversión hasta alcanzar la homogeneidad y se guarda a -80°C .

Al día siguiente, a las 8:00 h, se coge 1 mL en dos tubos de 1,5 mL de uno de los Erlenmeyer y uno de ellos se centrifuga, pues servirá como blanco para el otro. Se realiza lo mismo con el control preparado y las muestras del inóculo cogidas del día anterior. Los blancos y las muestras se diluyen 1:10 (o lo necesario para que entre en el rango lineal de la Ley de Lambert-Beer) en las cubetas del espectrofotómetro y se mide su OD_{600} . La cantidad de biomasa da una idea de la producción obtenida. A las 8:30 h, se mide de nuevo la absorbancia del mismo Erlenmeyer. Si el valor obtenido es mayor al anterior, se deja al cultivo crecer media hora más y se repite el procedimiento; por el contrario, si es igual o menor, se asume que las bacterias ya han abandonado la fase exponencial (Figura 22) y se detiene la producción.

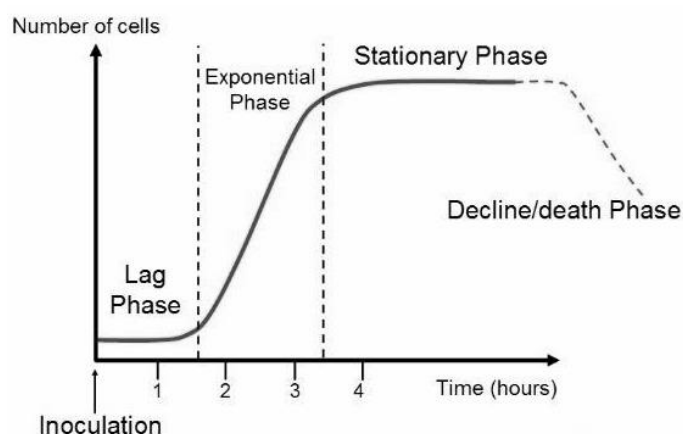


Figura 22. Curva de crecimiento bacteriano. Es de vital importancia no dejar que entren en la fase de apoptosis, lo cual implicaría la pérdida de la proteína deseada¹⁶.

Las muestras cogidas se preparan como se detalla en el apartado 4.2.8 y se observa por SDS-PAGE el rendimiento de la producción, teniendo en cuenta que, en función del valor de OD_{600} se resuspende en un volumen de agua ultrapura Milli-Q (Milli-Q) diferente (Tabla 6), para normalizar la cantidad de proteína que se cargará en la electroforesis:

OD_{600}	Resuspender en:
0,1-0,5	20 mL agua Milli-Q
0,5-2	50 mL agua Milli-Q
>2	100 mL agua Milli-Q
>5	200 mL agua Milli-Q

Tabla 6. Correspondencia de agua de resuspensión y absorbancia.

El contenido de los Erlenmeyer se centrifuga durante 15 min a $5000 \times g$ y 4°C , desechando el sobrenadante (junto con lejía) y repitiendo el proceso hasta recoger todo el pellet celular con la proteína de interés. Una vez obtenido, se procede al lavado de las células con el buffer de Lavado 1x, resuspendiendo el pellet en una pequeña cantidad del mismo mediante agitación vigorosa hasta la resuspensión total. El pellet resuspendido se centrifuga durante 15 min a $5000 \times g$ y 4°C .

Este último paso se repite hasta que el sobrenadante salga incoloro, conservando el pellet con el polímero deseado.

4.2.10- Extracción y purificación proteica

Con el objetivo de sacar la proteína del interior de la bacteria y comenzar a purificarla, se siguieron dos métodos de lisis celular en función del protocolo de purificación empleado: sonicación seguido de ciclos de transición inversa (ITC) o extracción con disolvente orgánico con posterior precipitación del polímero en acetonitrilo.

4.2.10.1- Sonicación celular e ITC

El pellet celular, que posee la proteína en su interior, se resuspende en *buffer* de sonicación 1x según la siguiente relación (Ecuación 5):

$$V(\text{mL}) = 5 \cdot \text{OD}_{600, \text{última muestra}} \cdot V_{\text{cultivo}}(\text{L}) \quad \text{Ecuación 5}$$

Además, se añade PMSF 1 M hasta una concentración final de 0,001M, el cual es un inhibidor de proteasas que evita la degradación proteica. Finalmente, se realiza la sonicación, que consiste en romper la pared celular bacteriana y la membrana plasmática mediante el uso de ultrasonidos a 4°C, empleando una energía máxima de 25000 J. El equipo *Hielscher UP400St* con termostato *Lauda Alpha RA 12* fue cedido por Dra. F. Ronda del grupo de investigación PROCEREAL de la UVA. Una vez rotas las células, el resto celular o *debris* se separa realizando una centrifugación a 4°C y 10000 x g durante 1 h 30 min. La naturaleza a esta temperatura de los polímeros tipo elastina es la de permanecer en la disolución y no en el precipitado, tal y como se explicó en el apartado 2.4.1.

Tras comprobar por SDS-PAGE que el polímero reside en el sobrenadante, se comienza la purificación mediante ITC. Debido a que los polímeros tipo elastina poseen la propiedad de disolverse en frío y precipitar en caliente gracias a su temperatura de transición, al sobrenadante que surge de los ultrasonidos se le somete a un ciclo caliente para provocar su precipitación. Esto suele ir acompañado de un lavado de la fase acuosa con NaCl ya que los iones de dicha sal secuestran las moléculas de agua al crear su propia esfera de hidratación facilitando la precipitación del polímero.

Después de provocar la precipitación en caliente y su separación del sobrenadante por centrifugación, el pellet obtenido se resuspende en agua Milli-Q durante toda la noche a 4°C para volver a disolver el polímero de interés. La disolución obtenida se centrifuga, esta vez conservando el sobrenadante donde se encuentra la proteína. En cada centrífuga ha de analizarse tanto el precipitado como el sobrenadante por SDS-PAGE, para comprobar si se ha perdido parte del polímero en alguna fase no deseada y conocer la pureza del mismo. Si se encuentra contaminado con otras proteínas, será necesario aplicar otro ciclo de ITC; de lo contrario, se podrá conservar el último sobrenadante frío, portador del ELP de interés. Este método es útil puesto que sólo los polipéptidos tipo elastina poseen este comportamiento reversible con la

temperatura, permitiendo así la purificación selectiva de estos polímeros frente al resto de proteínas endógenas bacterianas.

Finalmente, tras conseguir un sobrenadante frío puro, el polímero se somete a diálisis donde se eliminan las sales añadidas hasta que su concentración sea despreciable (del orden de 10^{-8} M) y, una vez finalizada, se congela la muestra dializada a -20°C durante unas horas. Para concluir, se elimina el agua del disolvente empleando bajas presiones por liofilización. El liofilizador *LyoQuest-55 Plus* fue cedido por el Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la UVA. Finalizada la liofilización, el polímero totalmente seco está listo para ser caracterizado.

4.2.10.2- Extracción orgánica y precipitación en acetonitrilo

Una alternativa a la sonicación mucho más rápida que el ITC clásico, puesto que este requiere normalmente tres o más ciclos para la purificación completa del polímero, es la extracción con disolventes orgánicos y la posterior precipitación de la proteína en acetonitrilo¹⁷. Al resuspender el pellet celular en 4 mL de disolvente orgánico/g de pellet se consigue la ruptura de las bacterias, separándose por centrifugación el *debris* del sobrenadante orgánico, que posee disuelto el polímero.

Posteriormente, se añade acetonitrilo puro hasta una concentración final del 70% (v/v), pudiendo observarse cómo el polímero precipita debido al cambio de polaridad producido por ambos disolventes orgánicos. Por centrifugación se eliminan los disolventes orgánicos y se dejan evaporar los restos de la mezcla orgánica en campana. Después se resuspende el pellet (la proteína de interés) a 4°C durante toda la noche en *buffer* de sonicación debido a que no posee una concentración salina alta (como el PBS 1x) que complicaría la diálisis posterior. Se separa el sobrenadante del precipitado por centrifugación, sometiendo al sobrenadante frío a un único ciclo de ITC con el fin de eliminar las impurezas de bajo peso molecular que queden. Para ello, se añade al polímero disuelto una disolución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta una concentración final del 20% (v/v) junto al calentamiento correspondiente, provocando su precipitación. A continuación, se centrifuga para separar el sobrenadante y el pellet, resuspendiendo este último en *buffer* de sonicación a 4°C al contener la proteína de interés. Tras disolver el ELP, se realiza una última centrifugación para separar el sobrenadante frío del precipitado y, tras analizar dicho sobrenadante por SDS-PAGE y comprobar la pureza del polímero, se dializa y liofiliza de acuerdo a lo descrito en el apartado 4.2.10.1.

4.2.11- Caracterización de polipéptidos tipo elastina

Una vez se ha extraído el polímero puro, se procede a su caracterización mediante distintas técnicas que nos permitan confirmar la correcta obtención del mismo:

4.2.11.1- Espectrometría de masas MALDI-TOF

La espectrometría de masas es una de las técnicas analíticas más completas actualmente, pues es capaz de analizar muestras complejas, es sensible, específica (detecta analitos en concreto) y universal (sirve para cualquier tipo de muestra), además de poder realizar análisis tanto

cuantitativos como cualitativos y proporcionar información estructural de las moléculas analizadas, así como información sobre sus características fisicoquímicas, energías de enlace, etc.

El esquema general de cualquier espectrómetro de masas consta de un dispositivo que permite la introducción de la muestra a presiones inferiores a 10^{-6} mbar, para posteriormente vaporizarla (si no es gaseosa) y e ionizarla en la fuente de iones, fragmentándola. Estos iones pasan al analizador, donde su trayectoria se verá desviada por campos eléctricos o magnéticos, sufriendo una desviación mayor o menor en función de su masa para una misma fuerza aplicada. El registro de los iones en el detector genera el espectro de masas, que posee forma de un gráfico de barras donde se representa la intensidad relativa de cada ion frente a su relación masa/carga (m/z). Como generalmente $z = +1$, el valor de m/z nos da la masa molecular. Hay dos tipos de fuentes de iones: duras, que generan una mayor fragmentación al aplicar mayor energía y por lo tanto se registran un mayor número de señales; y blandas, que aplican menos energía y por lo tanto dan un menor número de señales, aunque se pueden observar algunas como la correspondiente al ion fragmento inicial ($m/z = 1$), pico que con las fuentes duras podría perderse.

El espectrómetro de masas ideal para moléculas de gran peso molecular es aquél que utiliza el método de ionización con fuente blanda conocido como Desorción/Ionización por Láser Asistida por Matriz (MALDI), acoplado a un analizador de tiempo de vuelo (TOF) debido al gran rango de masas moleculares que es capaz de procesar (200-300 kDa). Para realizar la medida se mezcla una disolución acuosa/alcohólica de la muestra con un exceso de sustancia matriz que absorbe la radiación, siendo esta disolución evaporada en la sonda metálica de introducción de la muestra. A continuación, la muestra se expone ante un haz de láser pulsante que la sublima y la ioniza, permitiendo la aparición de señales de carga múltiple debido al tipo de fuente empleada. En el TOF los iones son acelerados hasta alcanzar la misma energía cinética y después son liberados en un tubo donde no hay ningún tipo de campo. La velocidad con la que llegan los iones al detector será inversamente proporcional a su masa, llegando antes, por lo tanto, los más ligeros¹⁸.

Para el análisis de polímeros, se pesa 1 mg de los mismos y el espectro lo realiza un técnico del LTI con un equipo *Bruker Autoflex*.

4.2.11.2- Resonancia Magnética Nuclear de protón (^1H -RMN)

La resonancia magnética nuclear es una técnica espectroscópica capaz de dar, entre otras, información estructural de la molécula estudiada. Se basa en la interacción de algunos núcleos atómicos con radiaciones del orden de la radiofrecuencia. Cuando un protón es alcanzado con la energía adecuada, sus estados nucleares, que inicialmente eran degenerados, se desdoblan en dos niveles de energía, habiendo un ligero exceso en el de más bajo valor energético, de acuerdo a la ley de distribución de Boltzmann (Ecuación 6):

$$\frac{N_j}{N_i} = e^{-\Delta E/kT} \quad \text{Ecuación 6}$$

donde N_j/N_i representa la relación entre los niveles, k es la constante de Boltzmann, T la temperatura del medio y ΔE la diferencia energética entre los mismos. Los núcleos sufrirán

transiciones entre ambos niveles de energía, bien excitándose o bien relajándose, produciendo un fenómeno que se conoce como resonancia. Este proceso permite la identificación estructural de la molécula, pues no todos sus núcleos poseen las mismas frecuencias de resonancia, viéndose estas alteradas por el entorno atómico. De esta manera se pueden identificar los distintos protones que poseen los polímeros para completar su correcta caracterización¹⁹.

Para analizar los polímeros, se prepara una disolución de cada uno de 16-20 mg/mL en un volumen mínimo de 600 μ L de DMSO deuterado. Posteriormente, se obtiene el espectro de ¹H-RMN empleando un equipo *RMN 400 Agilent Technologies* del LTI.

4.2.11.3- Análisis de aminoácidos por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) es una técnica analítica de separación altamente empleada por su elevada sensibilidad, capacidad de automatización y cuantificación exacta, entre otras características. La fase móvil es un líquido que atraviesa una fase estacionaria que, generalmente, está inmovilizada en una columna cromatográfica. En función de la misma y de cómo ocurra la separación, las cromatografías se clasifican en varios tipos: de reparto, de adsorción, iónica, de exclusión por tamaños, de afinidad y quiral. Los componentes que presenten fuertes interacciones con la fase estacionaria avanzarán más lentamente junto con el flujo de la fase móvil, mientras que los que posean uniones débiles con la misma lo harán más deprisa. Esto provoca la separación de los compuestos de una mezcla en bandas o zonas a lo largo de la columna, permitiendo su posterior recuperación en fracciones separadas²⁰.

El análisis de los aminoácidos de los polímeros fue realizado por el personal del LTI con un equipo *HPLC Agilent Technologies 1200 series*. Para ello, se les entregaron 5 mg de los polímeros pertinentes.

4.2.11.4- Dispersión dinámica de la luz (DLS)

La dispersión dinámica de la luz (DLS) es una técnica espectroscópica efectiva para medir el tamaño de las partículas que hay presentes en una disolución, yendo desde pocos nanómetros hasta 5 μ m aproximadamente. Consiste en realizar mediciones del ensanchamiento Doppler de la luz dispersada Rayleigh debido al movimiento de difusión traslacional de las partículas (movimiento browniano) cuando la disolución es iluminada con un haz láser monocromático. El movimiento térmico causa fluctuaciones temporales en la intensidad de la dispersión y ensancha la línea Rayleigh. La dependencia de dichas fluctuaciones con el tiempo se utiliza para obtener información sobre el tamaño de las partículas presentes en el medio (Figura 23).

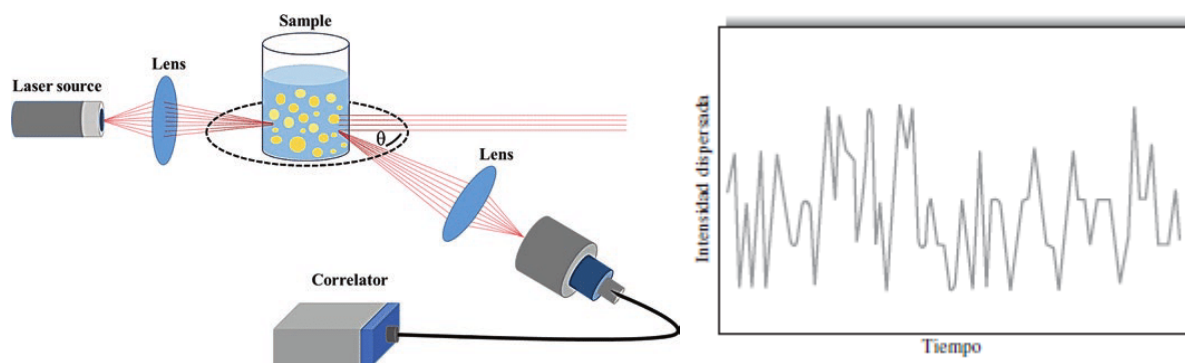


Figura 23. Esquema del equipo necesario para el DLS. La gráfica representa la variación de la intensidad de dispersión respecto al tiempo, necesaria para el cálculo del tamaño de las partículas^{21,22}.

Por lo tanto, el diámetro hidrodinámico (D_H) de las nanopartículas formadas por el polímero debido a su autoensamblaje, alcanzada su temperatura de transición, se puede determinar mediante el uso de esta técnica, empleando la ecuación de Stokes-Einstein (Ecuación 7), a través del coeficiente de difusión traslacional (D):

$$D_H = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad \text{Ecuación 7}$$

donde k es la constante de Boltzmann, T la temperatura del medio y η su viscosidad. A través del índice de polidispersidad (PDI), que señala el grado de variación del tamaño de las nanopartículas presentes en una muestra, podemos conocer la homogeneidad de la misma¹⁹.

El DLS también permite la medición del potencial zeta (ZP) de las nanopartículas, es decir, su carga neta superficial en el plano que separa el fluido en movimiento del medio del que se encuentra adherido a la nanopartícula. El equipo utilizado fue un *Zetasizer Nano ZSP* (Malvern) del Centro CARTIF del Parque Tecnológico de Boecillo.

4.2.11.5- Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los métodos térmicos pertenecen al conjunto de técnicas en las que se mide una propiedad física de una sustancia y/o de sus productos de reacción frente a la temperatura, mientras se somete a un programa de temperatura controlado. El más usado por su rapidez, sencillez y disponibilidad es la calorimetría diferencial de barrido (DSC), donde se mide la diferencia de calor entre la muestra y una sustancia de referencia frente a la temperatura, obteniéndose resultados de gran precisión y reproducibilidad. Como permite medir las variaciones de energía, es el método pertinente para el cálculo de la temperatura de transición de los polipéptidos tipo elastina. El equipo utilizado, cedido por el grupo PROCEREAL de la UVA, fue el *DSC 3 STAR® System* (Mettler Toledo)²³.

5- Resultados y discusión

5.1- Síntesis del polímero (SI)₂

5.1.1- Ligación del inserto (SI)₂ con el plásmido pET7 y amplificación del p7(SI)₂

El primer paso para la obtención del polímero es la construcción del plásmido recombinante que se utilizará para la bioproducción del mismo. Con este fin, primero ha de unirse el vector de expresión pET7 (linealizado previamente por el grupo con una enzima de digestión), de 5546 pb, junto con el inserto (SI)₂, de 3300pb (también sintetizado y linealizado en el Grupo de Biodispositivos Avanzados para Nanomedicina de la UVA) mediante una reacción de ligación (Figura 24). Para ello, se sigue el protocolo establecido por la casa comercial, en el cual se utilizan las cantidades adecuadas de los fragmentos génicos junto con la T4 ADN Ligasa y su tampón correspondiente, también aportado por la misma casa comercial.

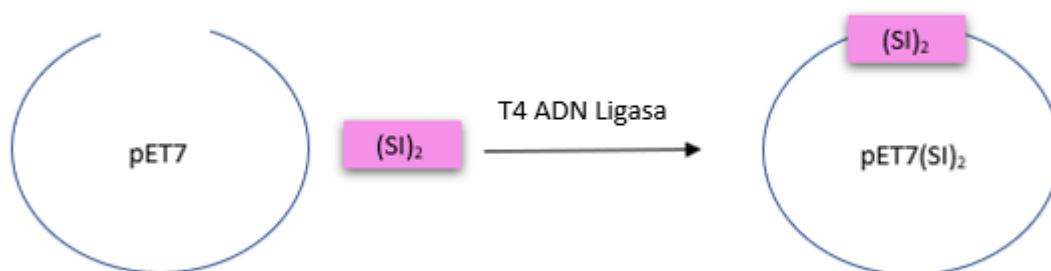


Figura 24. Esquema de la reacción de ligación para la obtención del p7(SI)₂.

La mezcla de la reacción permaneció a temperatura ambiente durante 1 h y, posteriormente, se realizó la transformación en células competentes DH5 α , con la intención de obtener transformantes del plásmido ligado y una mayor cantidad de este (como se indica en el apartado 4.2.3.1). De las colonias crecidas, se seleccionan y pican las de mejor morfología para cultivarlas en medio líquido que permita la posterior purificación del plásmido obtenido mediante el *NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid) Mini kit for plasmid DNA purification*, siguiendo el protocolo específico para plásmidos “low-copy” ya que se trata de un vector de expresión (apartado 4.2.4).

5.1.2- Digestión analítica del p7(SI)₂

Una vez se aíslan los correspondientes plásmidos se analiza la concentración y pureza de cada uno de ellos mediante el espectrofotómetro *Nanodrop* y se procede a comprobar que la inserción del inserto ha tenido lugar con éxito mediante una digestión analítica de DNA (apartado 4.2.5) y la posterior identificación de los fragmentos resultantes tras ser visualizados por una electroforesis en gel de agarosa (apartado 4.2.6).

Para ello se realizan dos ensayos (Figura 25): en primer lugar, se procede a la digestión del DNA con *NdeI*, enzima que cortaría al plásmido solo una vez y nos proporcionaría un plásmido linealizado cuyo tamaño sería de 8846 pb. Por otro lado, se realiza una codigestión con las enzimas *EcoRI* y *XbaI*, puesto que una de ellas permitiría linealizar el plásmido, y la otra separaría

al inserto junto con 69 pb extra. Por lo tanto, se esperaría ver un fragmento de 5547 pb correspondiente al p7 menos las bases anteriormente mencionadas, y otro de 3369 pb, del inserto (SI)₂ con dichas bases.

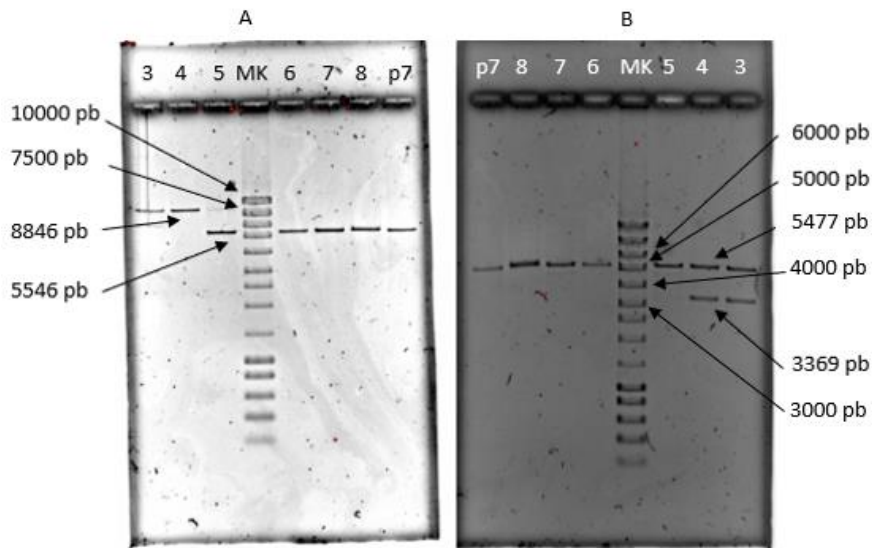


Figura 25. El gel A muestra el mapeo de restricción con *NdeI*, mientras que el B la codigestión mencionada. El marcador utilizado es el NZYLadder III, identificado como “MK”. Los números hacen referencia a las colonias seleccionadas y “p7” indica el plásmido de partida digerido con las respectivas enzimas a modo de control.

Se puede apreciar que, en el gel A, aparece un fragmento entre 10000 y 7500 pb que podría adjudicarse al producto de la ligación en las colonias 3 y 4, en comparación con el control p7, que es el plásmido linealizado y sin inserto. Por su lado, el gel B nos muestra varios fragmentos: uno asimilable al tamaño del p7 menos 69 pb (5547 pb) y otro al inserto más esas 69 pb (3369 pb). Por lo tanto, se confirma que la ligación ha ocurrido con éxito en la colonia 3 y la colonia 4, mientras que en el resto ha ocurrido un autoensamblaje del plásmido original a causa de la compatibilidad de los extremos generados. A continuación, se exponen las concentraciones obtenidas de cada plásmido y su nivel de pureza (Tabla 7):

Muestra	Conc. (ng/μL)	A260/A230	A260/A280
Col 3, 1º el.	202,4	2,03	1,88
Col 3, 2º el.	40,7	1,95	1,93
Col 4, 1º el.	190,9	2,01	1,88
Col 4, 2º el.	48,0	2,13	1,94

Tabla 7. Concentración y nivel de pureza de cada elución.

Comparando con el baremo de la Tabla 4, todos ellos alcanzan una pureza óptima y aceptable. Estos resultados concuerdan con la secuencia teorizada de los plásmidos de interés (apartado 4.2.7), la cual se confirmó posteriormente con una secuenciación de nucleótidos. Así, una vez obtenidos los plásmidos deseados se comenzó con la síntesis del polímero.

5.1.3- Bioproducción del (SI)₂

Una vez se obtiene el plásmido p7(SI)₂ con un grado de pureza óptimo, se procede a su transformación en la cepa competente de expresión bacteriana *BLR(DE3)* (apartado 4.2.3.2) para

comenzar a preparar la producción del polímero. Se pican un total de ocho colonias de las transformantes, sembrándolas en medio de expresión TB. A continuación, se decide cuál de ellas es la más productora realizando una electroforesis de proteínas tal y como se indica en el apartado 4.2.8, realizando el primer *screening*. Para ello se analizan las bandas correspondientes a las proteínas producidas por las bacterias de cada colonia, buscando que aparezca la correspondiente al peso molecular del polímero interés y evaluando su anchura e intensidad, parámetros indicativos de la cantidad de proteína que ha sido producida. Elegida la colonia más productora del primer *screening* (Figura 26), es decir, la que presenta la banda de ELP más ancha e intensa, se siembra en una nueva placa dicha colonia por agotamiento y se analiza el segundo *screening*. De este segundo *screening* se seleccionó de nuevo la colonia más productora, y fue con esta con la que se realizó el inóculo de la producción. A través de la traducción de la hebra codificante del p7(SI)₂ se dedujo la secuencia de aminoácidos del polímero, lo que nos permitió obtener que el peso molecular teórico del (SI)₂ es de 90,5 kDa. Una vez fue conocida su masa molecular y, por lo tanto, la banda a estudiar, se empleó un gel para la electroforesis del 10% de acrilamida para proceder a su análisis.

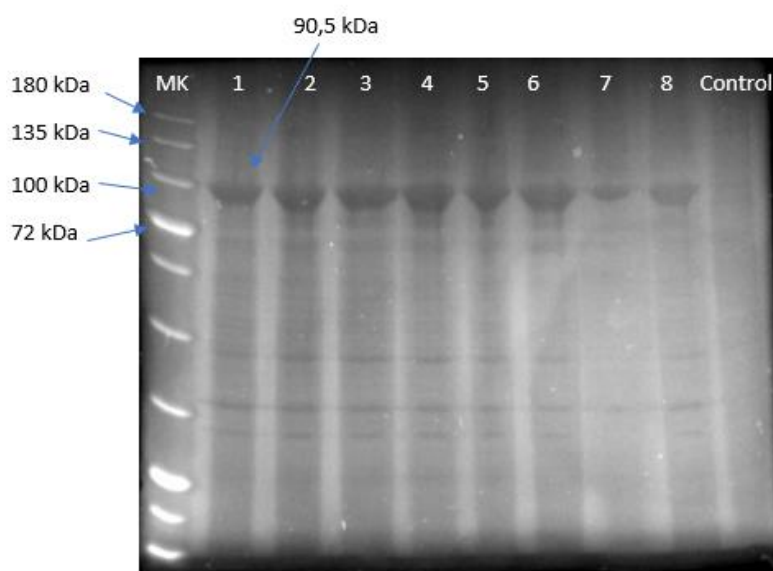


Figura 26. Primer *screening* del (SI)₂. El marcador utilizado es el NZYBlue Protein Marker.

En la Figura 26 se aprecian bandas más intensas y de mayor grosor que las proteínas endógenas de la bacteria, con una movilidad electroforética alrededor de 90 kDa, correspondiente al polímero de interés. Las colonias 3 y 4 se eligen como las más productoras, en base a sus anchuras e intensidades, y se siembran en dos nuevas placas de Petri. Puesto que la que mejor creció fue la colonia 4 finalmente fue esta la seleccionada para realizar el segundo *screening* (Figura 27).

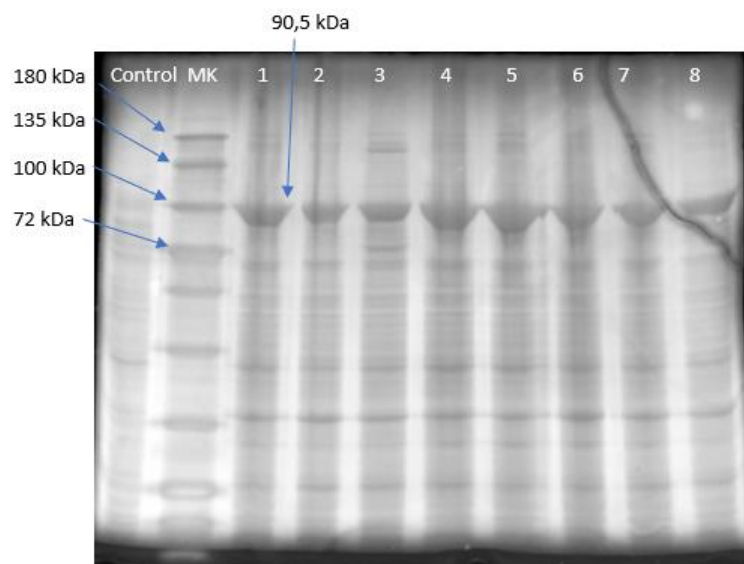


Figura 27. Segundo screening del $(SI)_2$.

En el segundo *screening*, las colonias 4 y 5 fueron elegidas como más productoras (mucho más que las del primer *screening*, tal y como se deduce de sus intensidades), y con ellas se preparó la producción según lo explicado en el apartado 4.2.9.

Así, para la producción se prepararon 5 L de medio de cultivo en 10 Erlenmeyer de 2 L, llenándolos hasta 1/4 de su capacidad (500 mL) para favorecer la aireación. El medio de cultivo elegido se compuso de 1/3 de medio LB y 2/3 de medio TB, y se emplearon tanto Erlenmeyers de vidrio, con y sin deflectores (que favorecen aún más el aporte de oxígeno) y de plástico con deflectores. La primera medida de la OD_{600} de la producción fue realizada tras 16 h de crecimiento, y la siguiente tras 16 h y 30 min, momento en el cual se detectó que la OD_{600} no variaba (Tabla 8) y por lo tanto el crecimiento bacteriano había llegado a fase estacionaria.

Muestra	OD_{600} (1:10)	OD_{600}
Control inóculo	0,525	5,250
Inóculo	0,455	4,550
Medida 8:30 h	0,367	3,670
Medida 9:00 h	0,365	3,650

Tabla 8. Absorbancias de la producción del $(SI)_2$.

La electroforesis realizada de los Erlenmeyer a las 16 h y 30 min en función del material (vidrio o plástico) y las características de los Erlenmeyer (con o sin deflectores), así como del control del inóculo y el inóculo es la siguiente (Figura 28):

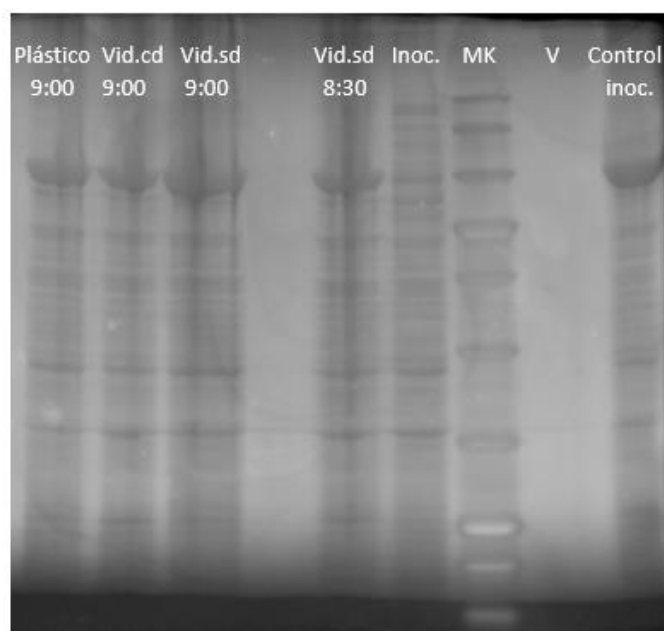


Figura 28. Electroforesis de la producción del $(SI)_2$. "Cd" hace referencia al uso de Erlenmeyers con deflectores y "sd" a sin deflectores.

En dicho *screening* se puede apreciar que la producción para un Erlenmeyer de vidrio sin deflectores es mayor que para uno con deflectores, lo cual parece contradictorio, pero se ve apoyado por la teoría de que más biomasa no implica mayor producción, puesto que el inóculo puede crecer de manera distinta en cada uno de los Erlenmeyer. Se aprecia también que el inóculo no posee una producción elevada, lógicamente, ya que fue cultivado en medio LB que favorece el crecimiento y no en TB, en el que prevalece la expresión de la proteína.

Una vez se para la producción se procede al lavado de las células donde se realizó un total de cuatro lavados con el *buffer* de lavado celular, consiguiendo que el sobrenadante obtenido fuera incoloro. Este paso es vital para obtener un polímero exento de los restos del medio de cultivo, que reducirían su pureza.

5.1.4- Purificación

Se eligió el ITC como método de purificación del polímero recombinante $(SI)_2$, por ser este un polímero nuevo no purificado anteriormente en el grupo de investigación, y el ITC el método más convencional para la purificación de ELPs. Para poner a punto el protocolo de ITC como método de purificación del $(SI)_2$, primeramente, se usó solamente la mitad del pellet de la producción. Para ello el primer paso fue romper las bacterias mediante una sonicación, utilizando la Ecuación 3, con 91,25 mL de *buffer* de sonicación y 91,25 μ L del inhibidor de proteasas PMSF 1000x, tal y como se describe en el *apartado 4.2.10.1*. Una vez lisadas las bacterias se realiza la centrifugación pertinente para separar los restos celulares del contenido citoplasmático, siendo esta última fase donde reside el ELP de interés. Tras observar por electroforesis que el polímero reside totalmente en el sobrenadante (Figura 29), se comienza su purificación por ITC.

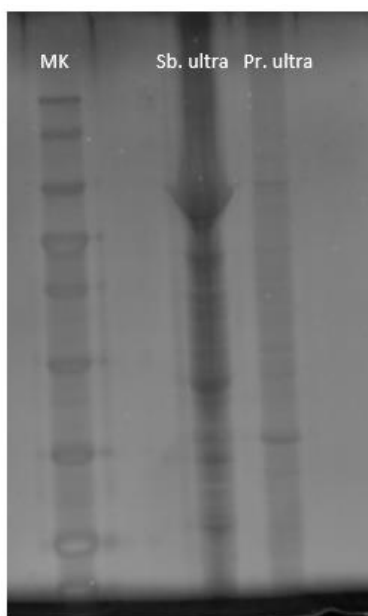


Figura 29. Electroforesis que indica que la proteína se encuentra en el sobrenadante del producto de sonicación. “Sb” indica sobrenadante y “Pr” precipitado.

En base a los resultados obtenidos en la electroforesis de cada ciclo se optimizaron las diferentes condiciones del método de ITC seguido para este polímero, siendo el esquema de purificación finalmente seguido el siguiente (Figura 30):

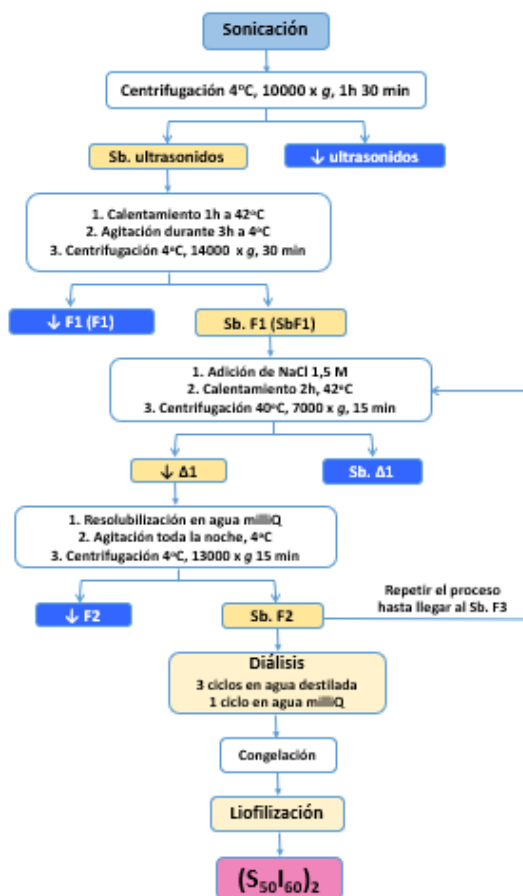


Figura 30. Esquema del ITC del $(SI)_2$. La “↓” se refiere a precipitado y “Sb” a sobrenadante.

De esta manera el polímero fue primeramente sometido a un ciclo de calentamiento y enfriamiento para provocar su precipitación y posterior solubilización para separarlo del resto de proteínas presentes en disolución. Es en ese momento cuando al sobrenadante obtenido por centrifugación (SbF1) se le pueden aplicar los ciclos de ITC.

En primer lugar, se probó a añadir 0,5 M de NaCl con la intención de disminuir la temperatura de transición del ELP, pero se observó que el polímero no precipitaba en su totalidad, pues una cantidad significativa del mismo se quedaba en el Sb Δ 1. En consecuencia a esto, a la fracción del sobrenadante contenedora de polímero se le fue aumentando gradualmente la cantidad de sal añadida, primero hasta 1 M y finalmente hasta 1,5 M hasta que se vio que el polímero precipitaba totalmente en la disolución. Así, cuando se aplicó 1,5 M directamente a la segunda mitad del pellet de la producción, se vio con claridad que no quedó ningún resto en el Sb Δ 1.

Para obtener el polímero completamente puro solo fueron necesarios 2 ciclos. La purificación completa se puede ver por electroforesis (Figura 31).

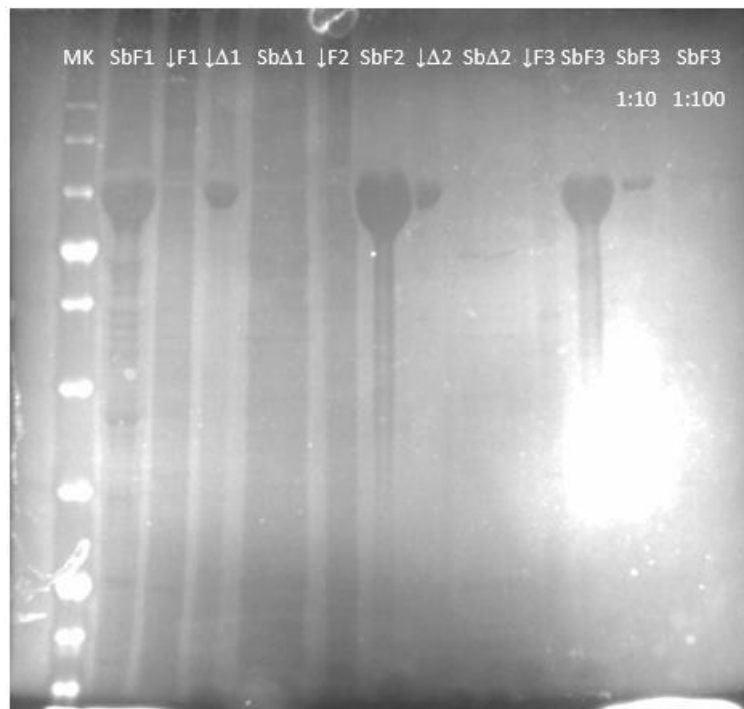


Figura 31. *Electroforesis de la purificación secuencial por ITC. La mala calidad de la foto se debe a una mala tinción del CuCl₂.*

En consonancia a lo anteriormente expuesto, en la Figura 31 se puede apreciar que en cada paso se van eliminando las proteínas interferentes que no poseen las propiedades fisicoquímicas (temperatura de transición) de los polímeros tipo elastina. Para poder evaluar la pureza del último sobrenadante se realizaron diluciones 1:10 y 1:100 del SbF3 para poder confirmar que no existen proteínas endógenas bacterianas en una cantidad significativa. Al no aparecer las bandas correspondientes a las mismas, se concluye que el ELP se encuentra puro.

Finalmente, obtenido el último sobrenadante frío con el polímero disuelto, este se sometió a diálisis para eliminar su concentración de NaCl hasta una prácticamente despreciable. Para ello el

sobrenadante fue sometido a 3 ciclos de diálisis con 25 L de agua destilada y un último ciclo de 25 L de agua Milli-Q.

La masa total del $(SI)_2$ después de congelarlo y liofilizarlo fue de 437,83 mg. Teniendo en cuenta que la producción se realizó en 5 L, el rendimiento obtenido fue de 87,566 mg/L de medio de cultivo.

5.1.5- Caracterización del biopolímero

Para comprobar la pureza del polímero y sus características fisicoquímicas este es analizado por las técnicas descritas en los apartados 4.2.8 y 4.2.11.

5.1.5.1- Determinación de la masa molecular aparente por SDS-PAGE

Con la electroforesis se puede ver si el polímero está efectivamente puro y, por tanto, libre del resto de proteínas endógenas bacterianas. Para realizar la electroforesis de un polímero puro se pesa 1 mg del mismo en un tubo de 1,5 mL y se disuelve a 1 mg/mL en agua Milli-Q a 4°C durante toda la noche y agitación continua (Figura 32).



Figura 32. Electroforesis del $(SI)_2$ completamente puro en un gel del 10%. Se cargaron 20 μ g de polímero.

Así, la electroforesis realizada mostró una banda correspondiente al polímero sin ningún otro tipo de proteína más presente, luego el polipéptido se habría conseguido obtener completamente puro.

La electroforesis del ELP puro nos permite calcular de manera aproximada su masa molecular a través del R_f . Para ello se realiza un ajuste lineal entre los R_f del marcador y el logaritmo en base 10 de las masas moleculares ofrecidas por el mismo con el fin de obtener una recta de calibrado (Tabla 9 y Figura 33).

M_m (kDa)	R_f	$\text{Log } M_m$
180	1,00	2,26
135	0,92	2,13
100	0,78	2,00
72	0,65	1,86
60	0,53	1,78
45	0,35	1,65
35	0,16	1,54
25	0,00	1,40

Tabla 9. Datos para el ajuste lineal, obtenidos por medición en papel.

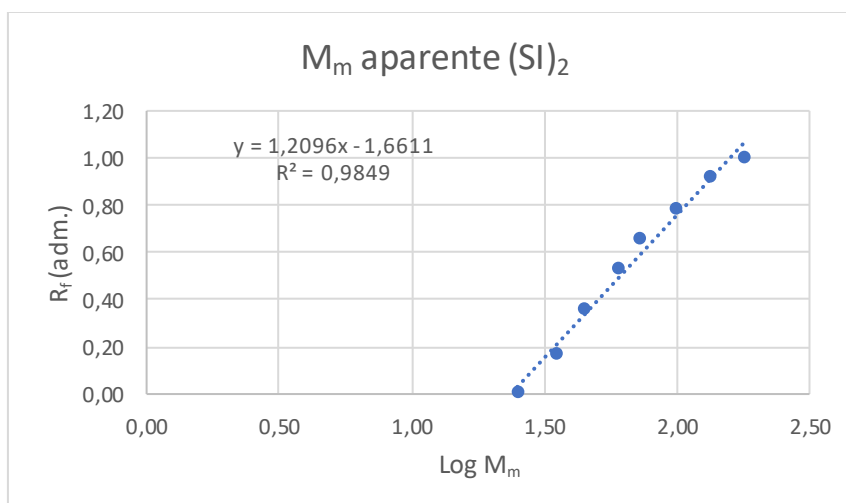


Figura 33. Representación del R_f frente al $\text{Log } M_m$.

Despejando de la ecuación generada $R_f = 1,2096(\text{Log } M_m) - 1,6611$ obtenemos que la M_m aparente es de 99,74 kDa (Tabla 10).

R_f	$\text{Log } M_m$	M_m (kDa) $(SI)_2$
0,76	2,00	99,74

Tabla 10. Determinación del peso molecular aparente del $(SI)_2$

Como se puede apreciar este valor es superior al teórico: 90,5 kDa. Esto es debido a que en la electroforesis la proteína sufre retraso electroforético por su naturaleza hidrofóbica, viéndose su avance entorpecido a través del gel al encontrarse en medio acuoso.

5.1.5.2- Análisis de la composición por ^1H -RMN

A la vista del espectro de ^1H -RMN obtenido del $(SI)_2$ a 16 mg/mL en DMSO deuterado (Anexo, apartado 8.1), se comparan los datos obtenidos experimentalmente con los valores previamente teorizados (Tabla 11):

Tipo de ^1H	Teóricos	Experimentales
CH_3 (~0,5-1 ppm)	2040	2040,00
CH_2 y otros CH (~1-2 ppm)	1240	1233,16
CH_α (~3,5-4,5 ppm)	2180	1918,12
OH (~5 ppm)	100	87,61
NH (peptídico) (~7-9 ppm)	880	758,78

Tabla 11. Clasificación de los protones del polímero $(SI)_2$ para su identificación.

Como se aprecia en los resultados de la Tabla 11, si normalizamos la señal de los grupos metilo, el conjunto de señales correspondiente a los grupos alcohol es el más preciso respecto a los valores teóricos. Además, esta señal resulta característica de la familia de ELPs basados en el tetrabloque (SI)₂, por pertenecer únicamente a las serinas presentes. El resto de señales sufre una ligera desviación con respecto a la cantidad de protones prevista. El incremento del número de protones correspondientes a los grupos amida de los enlaces peptídicos puede deberse a que dicho grupo funcional se encuentra en equilibrio entre su forma protonada y su forma neutra, lo cual también depende del pH al que se encuentre la muestra. En este caso el valor teórico se calculó en base a que dicho grupo no estaba protonado ya que el polímero se encontraba en un pH fisiológico. En adición a lo anterior, para facilitar el cálculo teórico no se tuvo en cuenta la interacción total entre los distintos pentapéptidos en el polímero lineal ni su estructura terciaria, por lo que la no coincidencia del resto de señales experimentales con las teóricas puede deberse a la influencia de la estructura tridimensional final de la proteína en cada uno de los desplazamientos.

A pesar de lo expuesto, los valores experimentales son lo suficientemente próximos a los teorizados, concluyendo que la estructura del polímero es la esperada.

5.1.5.3- Determinación de la masa molecular por MALDI-TOF

Los espectros de masas obtenidos (*Anexo, apartado 8.2*) fueron realizados en una matriz de 2,5-dihidroxiacetofenona disolviendo el polímero en agua a una concentración 1 mg/mL, apreciándose hasta la segunda ionización. El P_m experimental medio obtenido es de 90958 Da. Comparando con el peso molecular teórico (90500 Da), la diferencia con respecto al valor empírico es de 458 Da.

Puesto que los valores encontrados del peso molecular teórico, aparente y experimental son parecidos, se confirma que el peso molecular del (SI)₂ obtenido es el predicho.

5.1.5.4- Análisis de la formación de nanopartículas mediante DLS

Debido a la naturaleza anfifílica del polímero, se hipotetizó que el polímero sintetizado fuera capaz de formar nanopartículas, donde el bloque hidrofóbico I₆₀ formaría el interior de la misma formando un núcleo exento de agua, mientras que el bloque hidrofílico S₅₀ permanecería en el exterior formando una corona en contacto con el agua. Además, como los aminoácidos huéspedes no poseen carga neta, las nanopartículas formadas deben tener carga formal neutra. El estudio de formación de estas micelas se realizó en condiciones fisiológicas por encima y por debajo de su posible temperatura de transición, a 4°C y 37°C, para comprobar la capacidad de transición del polímero una vez superada su T_t (Tabla 12).

Disolvente	Temperatura	Diámetro (nm)	PDI	ZP (mV)
PBS 1x	4°C	41,10	1,000	-
	37°C	58,62	0,125	-
Agua Milli-Q	4°C	29,38	0,669	-
	37°C	202,00	0,190	-
NaCl 10 mM	4°C	-	-	-1,74
	37°C	-	-	-2,39

Tabla 12. Resultados de la formación de nanopartículas del (SI)₂.

Como se aprecia en los datos de la Tabla 12, el diámetro de las agregaciones formadas fue mayor a 4°C en PBS respecto del agua Milli-Q, lo cual se debe a la solvatación del polímero en PBS por la presencia de sales. De la misma manera, el polímero sufrió una contracción a 37°C en PBS. respecto del agua Milli-Q, posiblemente porque la concentración salina reduce la T_t del mismo y, por lo tanto, facilita la formación de la nanopartícula.

Valores de PDI < 0,2 se consideran óptimos para concluir que la población medida es homogénea, por lo que en PBS y en agua Milli-Q a 4°C se puede decir que existe una gran variación en el tamaño de los agregados que forma el polímero en la disolución. Esto concuerda con el hecho de que el polímero a 4°C se encuentra disuelto en el medio y totalmente extendido, obteniéndose valores de 29,28 – 41,10 nm, pero con un PDI de 1,00. Sin embargo, en condiciones fisiológicas se obtiene una población homogénea de nanopartículas de 58,62 nm, lo cual cuadra con que el ELP a temperaturas superiores a su T_t se encuentra en su forma insoluble y prácticamente organizado. Es decir, el polímero en condiciones fisiológicas se halla transicionado.

Los resultados en agua Milli-Q, sin embargo, muestran la formación de agregados más grandes, en comparación con el PBS, por encima de la T_t . Probablemente, esto se deba a la ausencia de sales del medio.

El valor del ZP indica cierta carga superficial negativa de las nanopartículas formadas, pudiéndose considerar prácticamente neutras. Esto se podría deber al carboxilo terminal que presentan las moléculas de polímero y, en gran medida, al glutámico de la secuencia de control de expresión de los ELPs: MESLLP.

Estos resultados son muy prometedores ya que el bloque de serinas, por no ser excesivamente hidrofílico, podría haber dificultado la formación de estas nanopartículas.

5.1.5.5- Determinación de la temperatura de transición mediante DSC

Mediante la DSC se determinó de T_t del polímero en PBS, imitando así las condiciones fisiológicas. Las muestras se prepararon a una concentración de 50 mg/mL, y se analizaron con un protocolo de temperatura que incluía una isoterma de 5°C durante 10 min previa a una rampa de temperatura que iba de 5°C a 70°C a una velocidad de 5°C/min (Anexo, apartado 8.5). De esta manera se obtuvo una T_t de 14,84°C para el (SI)₂. Esta característica hace a este ELP idóneo para la encapsulación de fármacos ya que asegura que el polímero se encontrará transicionado en condiciones fisiológicas.

5.1.5.6- Determinación de la composición aminoacídica mediante HPLC

Para confirmar la correcta composición del polímero, se llevó a cabo el análisis de sus aminoácidos mediante HPLC (Tabla 13).

Aminoácido	Valor teórico	Valor experimental
M	1	0,75
E	1	0,50
S	101	115,31
L	2	1,49
V	220	207,48
P	221	223,90
G	440	445,43
I	120	115,43
Total	1106	1110,30

Tabla 13. Análisis de aminoácidos del (SI)₂.

Tal y como se observa en los valores experimentales para cada aminoácido, expuestos en la Tabla 13, no hay diferencias significativas entre los valores teóricos y los encontrados experimentalmente, luego se corrobora que la composición del polímero es la esperada.

5.2- Síntesis del polímero 3CK₂₄(SI)₂

5.2.1- Bioproducción del 3CK₂₄(SI)₂

Partiendo del vector de expresión p10NCCC ligado al inserto K₂₄(SI)₂ se realizó la transformación del mismo en la cepa de expresión de *E. coli* "SHuffle® T7 Express Competent *E. coli*" (apartado 4.2.3.3) para preparar la producción del polímero. Se realizó el primer y segundo screening (Figura 34) con el objetivo de determinar las colonias más productoras, picándose un total de ocho colonias en cada uno y sembrándolas en medio TB. Debido al nuevo bloque de lisinas y la adición de 3 cisteínas en el extremo N-terminal, el peso molecular teórico del polímero, obtenido de manera análoga al (SI)₂, es de 101,4 kDa, recurriéndose a geles del 10% de acrilamida para realizar las SDS-PAGE.

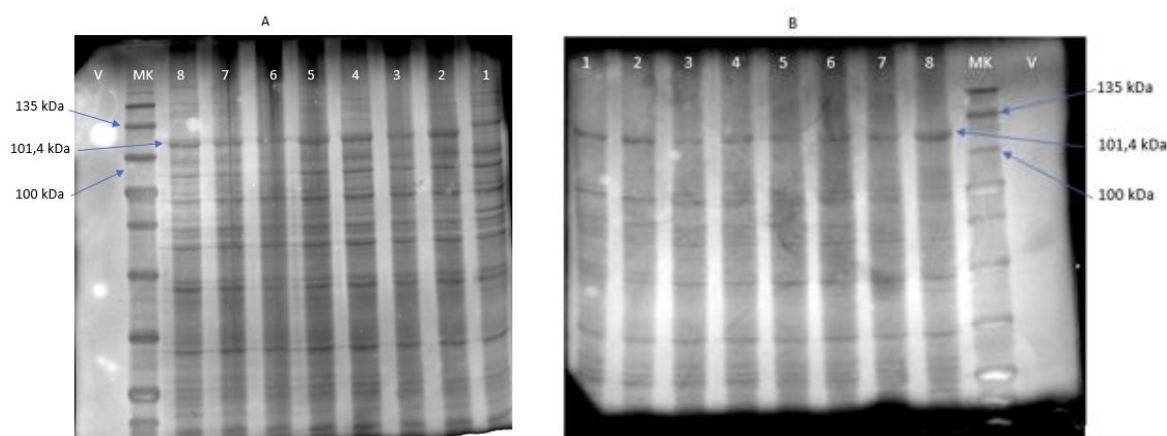


Figura 34. La electroforesis A muestra el primer screening, mientras que el gel B el segundo screening, donde los números hacen referencias a las colonias picadas de cada uno. El marcador (MK) utilizado es el NZYBlue Protein Marker "V" indica calle vacía, es decir, sin muestra. Se indican los pesos moleculares de las bandas correspondientes al polímero de interés y las del marker que lo flanquean.

Atendiendo a la anchura e intensidad de la banda de la proteína de interés, en el primer *screening* (Figura 34, gel A) se eligió la colonia 4 como la más productora, la cual se siembra por agotamiento. Analizando las colonias hijas en el segundo *screening* (Figura 34, gel B), se eligió la colonia 8 como la más productora de acuerdo a los criterios anteriores, siendo la candidata para preparar el inóculo de la producción del 3CK₂₄(SI)₂.

De esta manera, se prepararon 4,6 L de medio de cultivo en 8 Erlenmeyer de 2 L. La primera medida de la OD₆₀₀ se realizó a las 16 h de crecimiento, y la segunda a las 16 h y 30 min, momento en el que se determinó que se había alcanzado la fase estacionaria del crecimiento bacteriano (Tabla 14). Con el objetivo de evaluar las condiciones óptimas de generación de biomasa y producción y estudiar la relación de $V_{\text{cultivo}}:V_{\text{recipiente}}$ que permita la perfecta aireación para este fin, se midieron las OD₆₀₀ de los Erlenmeyer utilizados (Tabla 15) atendiendo a las propiedades físicas de los mismos y la composición y cantidad de los medios de cultivo, contando con una pareja de Erlenmeyer de cada tipo, que son los siguientes: 500 mL de TB sin deflectores, 400 mL de TB con deflectores, 400 mL de TB sin deflectores, 500 mL de LB de autoinducción con deflectores y 500 mL con 1/3 de LB 2X y 2/3 de TB (LB + TB) con deflectores.

Muestra	OD ₆₀₀ (1:10)	OD ₆₀₀
Control inóculo	0,674	6,740
Inóculo	0,200	2,000
Medida 8:05 h	0,466	4,660
Medida 8:35 h	0,435	4,350

Tabla 14. Medidas de las densidades ópticas realizadas indicativas de la entrada del crecimiento bacteriano en fase estacionaria.

Muestra	OD _{600,1} (1:10)	OD _{600,2} (1:10)	OD _{600, media} (1:10)	OD _{600, final}
TB 400 mL SD	0,435	0,395	0,4150	4,150
TB 400 mL CD	0,375	0,376	0,3755	3,755
TB 500 mL SD	0,288	0,350	0,3190	3,190
LB Indc. 500 mL CD	0,215	0,220	0,2175	2,175
LB + TB 500 mL CD	0,425	0,312	0,3685	3,685

Tabla 15. Absorbancias medidas de cada pareja de Erlenmeyer. "SD" significa sin deflectores y "CD" con deflectores. Uno de los Erlenmeyer de 400 mL de TB SD fue utilizado para determinar la detención de la producción.

Según los valores de OD₆₀₀ expuestos en la Tabla 15 se observa que las condiciones en las que el crecimiento bacteriano ha sido mayor fueron en el par de Erlenmeyer con 400 mL de TB sin deflectores, seguido de los dos Erlenmeyer con 400 mL de TB con deflectores y, finalmente, los que contenían la mezcla de 500 mL de medios LB + TB con deflectores. De acuerdo a esto, se deduce que la presencia de deflectores favorece la aireación, así como la relación 1:5 $V_{\text{cultivo}}:V_{\text{recipiente}}$. Esto es lógico ya que el medio TB es un medio muy rico y la relación 1:5 implica mayor cantidad de aire en el Erlenmeyer, lo cual favorece el crecimiento bacteriano. Por el contrario, los Erlenmeyer con 500 mL de LB de autoinducción son los que presentaron menor cantidad de biomasa.

En paralelo, se analizó la expresión proteica de cada tipo de Erlenmeyer mediante SDS-PAGE (Figura 35).

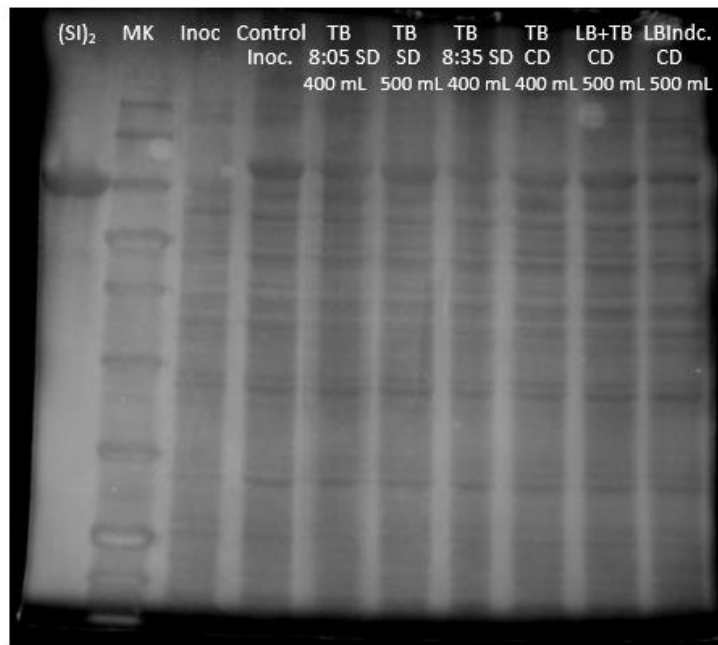


Figura 35. Análisis por SDS-PAGE de la bioproducción del 3CK₂₄(SI)₂. Se indica la hora en la que fueron tomadas las muestras de 400 mL de TB sin deflectores, puesto que fueron utilizadas para determinar que el crecimiento bacteriano se encontraba en fase estacionaria.

Se contempla en la electroforesis que los Erlenmeyer con 500 mL de LB autoinductor con deflectores fueron los que menos han expresado la proteína de interés a pesar de su cualidad autoinductora, mientras que los que contenían 500 mL de TB sin deflectores ($OD_{600} = 3,190$) y 500 mL de LB + TB con deflectores han sido los que más la han producido ($OD_{600} = 3,685$). Esto se debe a que el TB empleado fue un TB de autoinducción, lo que permite una mayor generación de biomasa gracias a que evita la absorción de lactosa hasta que la glucosa se agota, momento en el cual se induce la producción que, por haber mayor crecimiento, debería de dar lugar a mayor cantidad de proteína. Además, la mezcla LB + TB anteriormente ha dado altos rendimientos en la producción de otros polímeros del grupo, por lo cual los resultados observados en la electroforesis son los esperados.

Para concluir, el control del inóculo es el que poseía la OD_{600} más elevada. Esto es debido a que, en los Erlenmeyer, se añadió 1 mL de inóculo en 500 mL de medio, quedando en una proporción 1:500, mientras que, en el control, al añadirse 1 mL de inóculo en 5 mL de medio su proporción es de 1:5. En base a lo anterior, es de esperar que si se aumentara la cantidad de inóculo en los Erlenmeyer también hubiese una mayor producción de biomasa.

5.2.2- Purificación

5.2.2.1- Purificación por ITC

Los polímeros tipo elastina que poseen cisteína en su estructura tienen la capacidad de formar puentes disulfuro tanto inter como intracatenarios consigo mismos y con otras proteínas presentes en el citoplasma bacteriano. Dicha unión es muy fuerte, motivo por el cual su

solubilidad se ve reducida y, por lo tanto, la purificación por ITC se ve dificultada por la tendencia de esta familia de ELP a permanecer en los precipitados en lugar de los sobrenadantes, según los resultados previos obtenidos por el grupo. Para solventar este impedimento se diseñó un protocolo de purificación por ITC (Figura 36) que incluyese un paso previo de reducción de los puentes disulfuro del polímero empleando β -mercaptoetanol hasta una concentración final 0,1 M. Asimismo, sería interesante que las lisinas del $3CK_{24}(SI)_2$ se encontrasen protonadas en vista a futuras aplicaciones en dosificación de fármacos. En base a esta consideración, se trabaja en pH inferiores al pK_a de las lisinas cuando se encuentran en el polímero, es decir, a $pH < 10$.

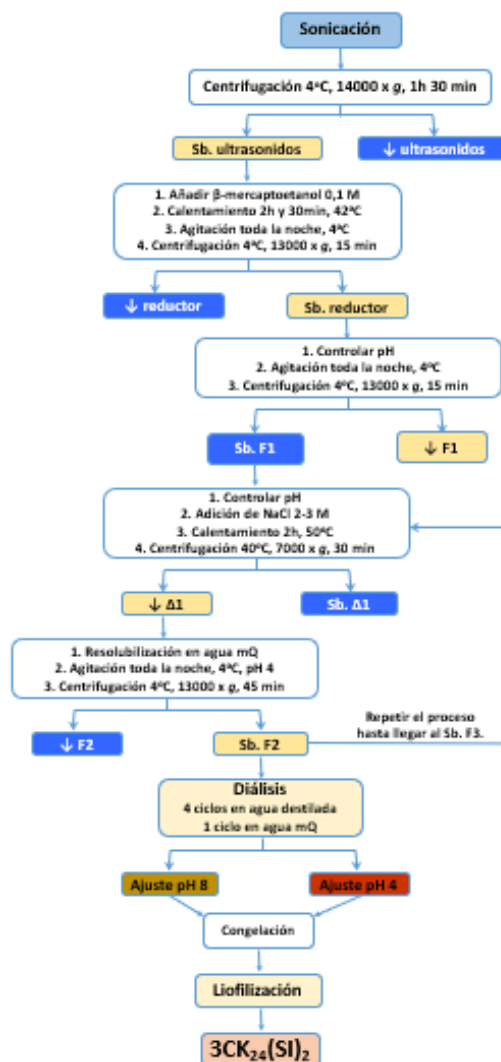


Figura 36. Esquema de purificación por ITC seguido para el $3CK_{24}(SI)_2$

Teniendo en cuenta lo anterior, la purificación por ITC comenzó con la lisis bacteriana de la mitad del pellet de la producción mediante una sonicación empleando 84,78 mL del *buffer* de lisis celular (tomando como OD_{600} final la media de los valores de la Tabla 15 otorgados por los Erlenmeyer, resultando un valor de $OD_{600} = 3,391$). Tras realizar la centrifugación pertinente para separar los restos celulares del citosol bacteriano, se vio por electroforesis que no todo el polímero residía en el sobrenadante, sino que una cantidad importante del mismo permanecía en el precipitado (“↓ultra”) (Figura 37). Este hecho obligó a realizar una segunda sonicación que no consiguió

extraer la totalidad de la fracción que permanecía en dicho precipitado, por lo que se decidió seguir purificando la parte del ELP que sí se consiguió separar.

Midiendo el pH de cada sobrenadante generado en cada paso del ITC, se comprobó que este poseía un valor en torno a 8, por lo que no era necesario un ajuste del mismo para conseguir la protonación de las lisinas anteriormente mencionada. En vista que era necesaria una concentración de NaCl 1,5 M para provocar la precipitación del (SI)₂, se probó a añadir durante el primer ciclo de ITC una concentración de NaCl 2 M para reducir la temperatura de transición del polímero, pues es de esperar que, al poseer un bloque hidrofílico compuesto por lisinas, dicha temperatura fuese mayor a la T_t del (SI)₂. Esta concentración de NaCl consiguió la precipitación total del polímero durante el primer ciclo de ITC, pero, en el segundo ciclo, fue necesario aumentar la cantidad de NaCl gradualmente hasta 3 M. De acuerdo a lo previsto, la purificación iba a ser entorpecida por la tendencia del polímero a quedarse en el pellet (“↓ultra”, “↓red” y “↓F”) (Figura 37). Para obtenerlo completamente puro solo fueron necesarios 2 ciclos.

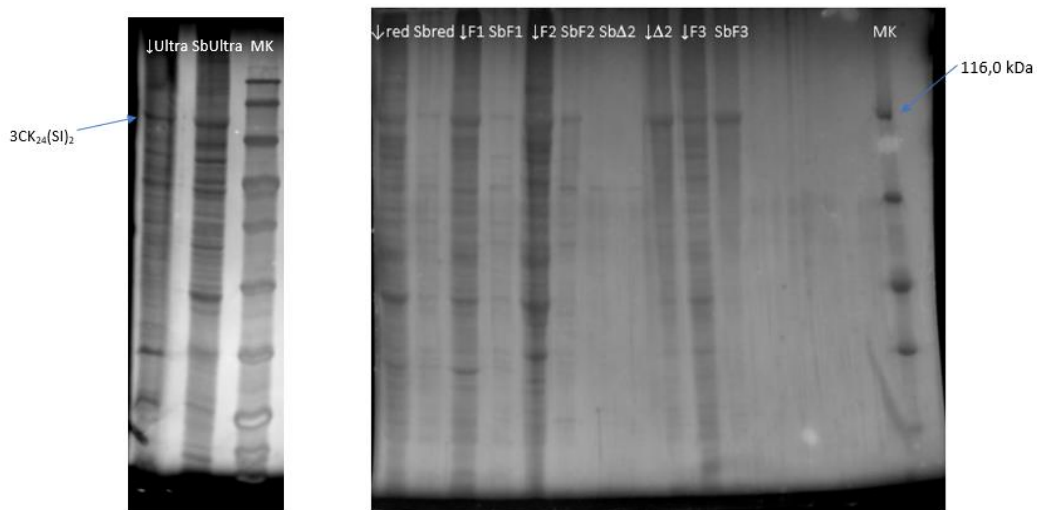


Figura 37. Representación del esquema de purificación desde la sonicación hasta el SbF3, donde “↓” indica precipitado y “Sb” sobrenadante. El marcador utilizado en el gel de la derecha es el Unstained Protein Molecular Weight Marker.

Como se aprecia en la electroforesis, una gran cantidad de polímero se queda en los precipitados señalados sin conseguir su completa extracción. Para intentar separarlo en su totalidad del precipitado F3, el cual proporcionaría el sobrenadante más puro, se trató al mismo con β-mercaptoetanol hasta una concentración final de 0,1 M, procurando reducir los posibles puentes disulfuro que pudieran haberse formado con otras proteínas insolubles presentes en la bacteria (Figura 38). Asimismo, la resuspensión de dicho precipitado tuvo lugar a 4°C en un tampón acético/acetato con el fin de ajustar el pH a un valor de 4,75. El objetivo de este tratamiento es asegurar la protonación de las lisinas del polímero, aumentando el carácter hidrofílico del bloque y, por lo tanto, provocando un aumento de la temperatura de transición del polímero. A causa del aumento de la T_t, se facilita la disolución en frío del ELP.

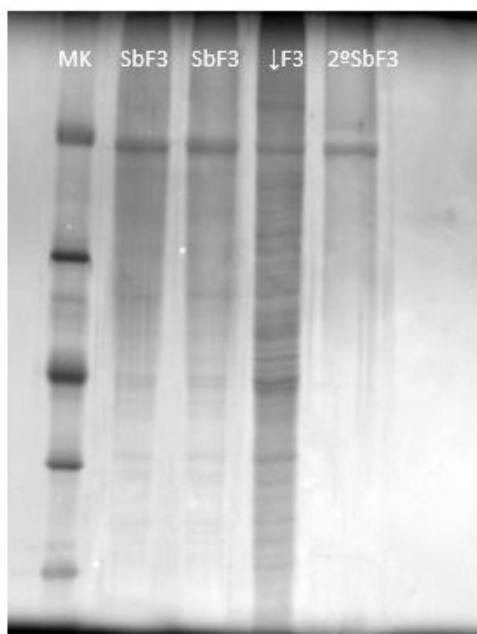


Figura 38. Electroforesis posterior a la resuspensión del precipitado F3 con el agente reductor β -mercaptoetanol en medio ácido, siendo el 2ºSbF3 el generado con dicho tratamiento.

Como se aprecia en la electroforesis de la Figura 38 se ve que el polímero de interés residente en el segundo SbF3 salió más puro, exento de cualquier proteína endógena de la bacteria, que el generado en primera instancia sin este agente reductor en medio ácido, pese a que no consiguió extraer la totalidad del polipéptido. Queda pendiente, por lo tanto, la optimización de la purificación por ITC para conseguir la extracción total del polímero de los precipitados donde reside.

Una vez fueron obtenidos los sobrenadantes fríos con el polímero disuelto y puro, se sometieron a diálisis con el fin de eliminar la concentración de NaCl hasta un valor despreciable. Con este fin, fue necesario someter los sobrenadantes a 3 ciclos de diálisis con 25 L de agua destilada y un último de agua Milli-Q. El producto de la diálisis fue dividido en dos para un estudiar el comportamiento del polímero a diferentes pH. Así a una mitad se le ajustó el pH hasta un valor de 4 y la otra fue llevada a pH 8. En este último caso se hipotetizó que las lisinas se encontrarían protonadas en su mayor parte al encontrarse dicha fracción por debajo del pK_a de las mismas. El estudio y caracterización de esta posible protonación y desprotonación se realizó mediante distintas técnicas (*apartado 5.2.3*).

La masa del $3CK_{24}(SI)_2$ que se obtuvo por ITC, después de congelado y liofilizado, fue de 257,94 mg. Puesto que dicha cantidad es la asociada a la mitad del pellet de la producción, el rendimiento obtenido para un cultivo de 4,6 L, por extrapolación, fue de 112,15 mg/L de medio, siendo 1,28 veces superior al rendimiento conseguido con el $(SI)_2$.

5.2.2.2- Purificación por extracción con disolventes orgánicos y precipitación en acetonitrilo.

Teniendo en cuenta los inconvenientes presentados por la purificación por ITC y la incompleta separación del polímero de los restos celulares tras la lisis bacteriana, se probó la purificación alternativa que incluye la extracción con disolventes orgánicos y la precipitación de la proteína en

acetonitrilo (*apartado 4.2.10.2*) con la otra mitad del pellet de la producción y la fracción que no pudo ser separada de los restos celulares tras la sonicación. Sin embargo, no tuvo éxito, ya que todos los SDS-PAGE realizados con las fases generadas en dicho método no presentaban ningún tipo de banda. Además, los sobrenadantes finales obtenidos se congelaron y liofilizaron asociando el problema a una gran dilución de las proteínas presentes que impidiera su apreciación por SDS-PAGE. Una vez liofilizado, el sólido que apareció se trató de manera pertinente para analizarlo por electroforesis (1 mg/mL) junto con el pellet tratado con los disolventes orgánicos, no sólo no apareciendo ningún tipo de banda de ninguna proteína, sino que el pellet aún poseía el polímero de interés. Atendiendo a los resultados se concluyó que el disolvente orgánico no fue capaz de extraer el polipéptido de manera efectiva, que permanecería en los restos celulares, lo cual dificultaría el desarrollo de las electroforesis provocando que finalmente no se visualizara nada.

En conclusión, habría que estudiar de manera detallada los parámetros de dicho método con el fin de conseguir lograr purificación empleando este protocolo, pero, por ahora, el método viable para extraer el ELP puro es el ITC.

5.2.3- Caracterización del biopolímero

En el caso del 3CK₂₄(SI)₂ purificado por ITC sólo fue posible la caracterización de la fracción que fue ajustada a pH 8, puesto que la que poseía un pH 4 no se pudo disolver ni en agua, ni en DMSO, invalidando su estudio por RMN y MALDI-TOF. Su insolubilidad en PBS impidió también el análisis de su T_t por DSC. Este comportamiento tan contrario a la naturaleza reversible de los ELPs lleva a pensar que el polímero pudo haberse degradado durante el ajuste de su pH ya que en el proceso el pH alcanzó valores de 2, punto crítico ya que en estas condiciones los ELPs se degradan rápidamente. Por este motivo, los resultados expuestos en este apartado de *Caracterización del biopolímero* corresponden a la fracción purificada por ITC y ajustada a un pH 8.

5.2.3.1- Determinación de la masa molecular aparente por SDS-PAGE

El SDS-PAGE de la Figura 39 muestra al 3CK₂₄(SI)₂ puro y libre del resto de proteínas de la bacteria. Con dicha electroforesis se puede calcular el peso molecular aparente del polímero (Tabla 16 y Figura 39) realizando un ajuste lineal entre el R_f del marcador y el logaritmo en base 10 de las masas moleculares que este mismo ofrece, obteniendo una recta de calibrado.

M _m (kDa)	R _f	Log M _m
116,0	1,00	2,06
66,2	0,76	1,82
45,0	0,69	1,65
35,0	0,54	1,54
25,0	0,34	1,40
18,4	0,18	1,26
14,4	0,12	1,16

Tabla 16. Relación de log M_m y R_f del marcador.

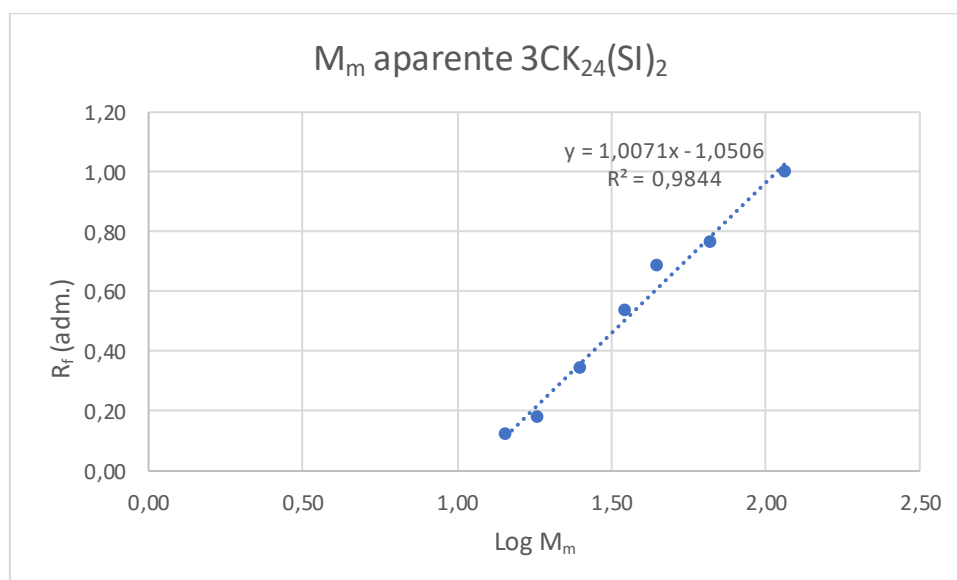


Figura 39. Representación de los datos de la Tabla 16.

Despejando de la ecuación obtenida $R_f = 1,0071(\text{Log } M_m) - 1,0506$, se obtiene que la masa molecular aparente del $3\text{CK}_{24}(\text{SI})_2$ es de 101,5 kDa (Tabla 17).

R _f	Log M _m	M _m (kDa) $3\text{CK}_{24}(\text{SI})_2$
0,97	2,01	101,5

Tabla 17. Peso molecular aparente del $3\text{CK}_{24}(\text{SI})_2$.

Comparando la masa molecular aparente obtenida de 101,5 kDa con el peso molecular teórico de 101,4 kDa, se concluye que el $3\text{CK}_{24}(\text{SI})_2$ no posee un gran retraso electroforético, al contrario de lo encontrado con el $(\text{SI})_2$, debido a su mayor carácter hidrofílico al portar el bloque de las lisinas adicional.

5.2.3.2- Análisis de la composición por ^1H -RMN

Observando el espectro de ^1H -RMN obtenido del $3\text{CK}_{24}(\text{SI})_2$ (Anexo, apartado 8.1) a una concentración de 16 mg/mL en DMSO deuterado, se realiza la comparación (Tabla 18) de los protones previstos de manera teórica con los que se obtuvieron experimentalmente:

Tipo de ^1H	Teóricos	Experimentales
CH₃ (~0,5-1 ppm)	2187	2187,00
CH₂ y otros CH (~1-2 ppm)	1483	1424,80
CH_α (~3,5-4,5 ppm)	2325	2263,86
OH (~5 ppm)	100	89,25
NH (peptídico) (~7-9 ppm)	979	858,03

Tabla 18. Clasificación de los protones del polímero $3\text{CK}_{24}(\text{SI})_2$.

Según los valores expuestos en la Tabla 18, normalizando la señal de los grupos metilo, el valor más preciso respecto al teórico corresponde a las señales asociadas a los grupos alcohol del polímero. Nuevamente se presenta este grupo de señales particulares de los polipéptidos que portan el tetrabloque $(\text{SI})_2$, siendo dichas señales exclusivas de las serinas de dicho bloque. Por otro lado, la disminución de los protones detectada en el grupo amida del enlace peptídico se debe al ya mencionado equilibrio existente, dependiente del pH, entre la forma protonada del

mismo y su forma neutra, provocando una variación respecto del número de protones predicho teóricamente. Este cálculo también se realizó suponiendo en el que las amidas no se encontraban protonadas al poseer la muestra un pH fisiológico. De la misma manera, no se consideró la interacción global de los pentapéptidos ni la estructura terciaria del polímero, pudiendo deberse las variaciones experimentales encontradas respecto de los valores teóricos a la influencia de la estructura terciaria del polipéptido en los desplazamientos químicos de los protones que componen su estructura.

Aun así, los valores teóricos son lo suficientemente próximos a los experimentales como para concluir que no hay diferencia significativa entre ellos y que la estructura del polímero era la anticipada.

5.2.3.3- Determinación de la masa molecular por MALDI-TOF

Los espectros de la muestra (*Anexo, apartado 8.3*) disuelta en DMSO a una concentración de polímero de 2 mg/mL mostraron las cuatro primeras ionizaciones. La masa molecular experimental media del polímero, asociada a la primera ionización, es de 101814. Comparando con el valor teórico de 101400 Da, la diferencia respecto del valor empírico es de 414 Da.

Esto indica que el peso molecular teórico, aparente y experimental son prácticamente semejantes y que por tanto la masa molecular del $3CK_{24}(SI)_2$ obtenida empíricamente era la prevista.

5.2.3.4- Determinación de la temperatura de transición mediante DSC

Utilizando las mismas condiciones que las descritas para el $(SI)_2$, se obtuvieron dos puntos de transición o T_t (*Anexo, apartado 8.5*). El primer punto, de menor temperatura, corresponde a una T_t de 14,67°C, análoga a la que presenta el $(SI)_2$, por lo que se dedujo que se debía a la transición del tetrabloque $(SI)_2$ del polímero; por otro lado, el segundo punto de transición corresponde a una T_t de 42,48°C, por lo que pertenecería a la transición del bloque de las lisinas que, debido a su carácter hidrofílico, necesita una mayor temperatura para desprenderse de las moléculas de agua en estructura de clatrato.

5.2.3.5- Determinación de la composición aminoacídica mediante HPLC

El número de aminoácidos visualizados en el análisis del polímero fueron los siguientes (Tabla 19):

Aminoácido	Valor teórico	Valor experimental
M	1	1,07
E	1	3,17
S	101	107,01
L	2	2,76
V	244	220,80
P	245	244,88
G	488	483,88
I	120	120,57
K	24	16,94
C	3	15,25
Total	1229	1216,30

Tabla 19. Análisis aminoacídico del $3CK_{24}(SI)_2$

Los valores experimentales son muy semejantes a los teorizados, a excepción de las lisinas (procedentes del bloque K₂₄), las cisteínas (del N-terminal) y los glutámicos (del bloque MESLLP) introducidos por el vector de expresión p10NCCC. Puesto que, por los tratamientos que se realizan a estos polímeros, es común la aparición de contaminantes que contengan cisteínas, los valores experimentales obtenidos por el análisis de aminoácidos pueden haberse visto afectados, dando lugar a un mayor número de cisteínas de las previstas.

No obstante, la proximidad de los valores teóricos y los valores encontrados empíricamente llevan a la conclusión de que el polímero posee la composición aminoacídica teorizada.

5.3- Síntesis del 3K(EI)₂

5.3.1- Purificación por extracción con disolventes orgánicos y precipitación en acetonitrilo

Después de que se obtuvo el plásmido p103K(EI)₂ por ligación previa del vector p10NKKK con el inserto (EI)₂ y se realizó su bioproducción por el personal del grupo de investigación, se probó el nuevo protocolo de purificación alternativo al ITC con extracción con disolventes orgánicos y posterior precipitación de la proteína en acetonitrilo (*apartado 4.2.10.2*). La finalidad de este método es reducir la cantidad de tiempo que dura la purificación en comparación con la purificación por ITC, además de intentar solventar problemas como la residencia del polímero en fases indeseadas, lo cual afectaría al rendimiento de la misma como ocurrió con el 3CK₂₄(SI)₂ (Figura 38). Para ello, se analizó por electroforesis las fases generadas por centrifugación en los distintos pasos de la purificación (Figura 40). Como el peso del 3K(EI)₂ es de 93,5 kDa, obtenido de forma similar al (SI)₂ y al 3CK₂₄(SI)₂, se emplearon geles del 10% de acrilamida para el estudio de la banda correspondiente por electroforesis.

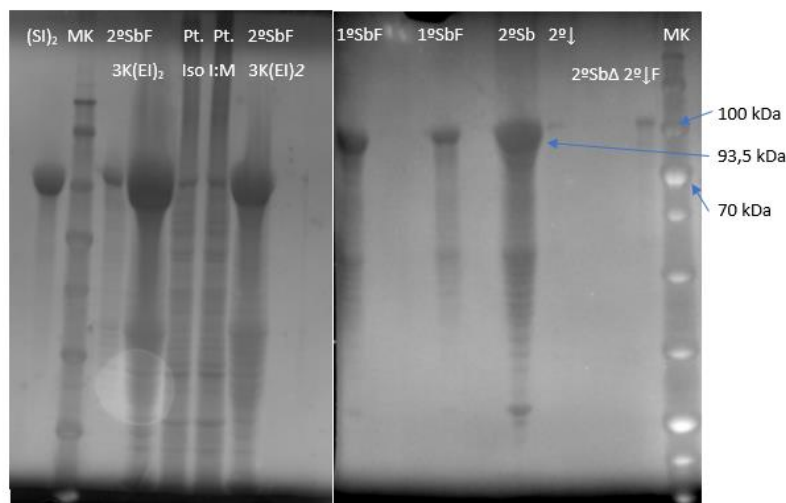


Figura 40. Purificación alternativa del 3K(EI)₂. "Pt" refiere a precipitado o pellet. Las fases donde se indican "F" (frío) o "Δ" (caliente) indican que pertenecen a la parte del ITC de dicha purificación.

En primer lugar, se separó el pellet de la producción en dos mitades, una con una masa de 18,5 g y la otra mitad con una masa de 16,65 g. La primera de ellas se resuspendió en 74 mL de isopropanol, mientras que la segunda en 71 mL de una mezcla isopropanol:metanol (1:1). El

objetivo de dicho ensayo fue comprobar el poder extracción del polímero de cada disolvente orgánico del pellet de la producción (referenciados como "Iso" y "I:M", Figura 40) que, como se puede apreciar en la electroforesis, tanto el isopropanol como la mezcla fueron capaces de separar la mayor parte de la proteína, quedando una pequeña cantidad aún en el pellet de la producción no comparable a lo extraído.

Posteriormente, se añaden 185 mL de acetonitrilo al isopropanol y 177,5 mL de acetonitrilo a la mezcla isopropanol:metanol provocando la precipitación de la proteína. Una vez separado el polímero y desechada la fase orgánica por centrifugación, se juntó la proteína precipitada y se resuspendió en *buffer* de sonicación a 4°C, aumentando la cantidad de *buffer* gradualmente hasta un volumen total de 19,06 mL debido a la incompleta resuspensión del ELP, lo cual generó dos fracciones (marcadas en la Figura 40 como "1º" y "2º"). Seguido a lo anterior, al sobrenadante obtenido por centrifugación ("Sb") se le añadió (NH₄)₂SO₄ saturado hasta una concentración final del 20% (v/v), provocando la precipitación del polímero y comenzando con el calentamiento del único ciclo de ITC para eliminar las proteínas de bajo peso molecular, con la posterior etapa fría del mismo. Atendiendo a la electroforesis, se aprecia que una ínfima parte de la proteína queda alojada en el precipitado antes del ciclo de ITC ("↓") y en el precipitado frío ("↓F") al final del ciclo, permaneciendo en mucha mayor cantidad en el sobrenadante frío ("SbF"), la fase de interés.

Dicho sobrenadante, a simple vista, parece mostrar que al polímero le acompañan una gran cantidad de impurezas proteicas, lo cual cuestiona la fiabilidad del método pues el fin era obtener en una única extracción con un solo ciclo de ITC el ELP puro, sin necesidad de eliminar con más ciclos las proteínas endógenas de la bacteria. Sin embargo, no se trata de impurezas sino de bandas correspondientes a la degradación del propio polímero. Para descartar la presencia de proteínas indeseadas, se realiza un ensayo consistente en una tinción doble (Figura 41). Dicho ensayo se fundamenta en que los ELPs se tiñen muy bien en CuCl₂ por su naturaleza hidrofóbica, mientras que en azul de Coomassie no, donde se teñirían bien los de carácter hidrofílico. En base a lo anterior, la doble tinción se realizó cargando en un gel de electroforesis de manera simétrica el sobrenadante con el polímero y cortando el gel por la mitad, tiñendo una de ellas en CuCl₂ y la otra en azul de Coomassie. De esta manera, ambas mitades se encontrarían en las mismas condiciones.

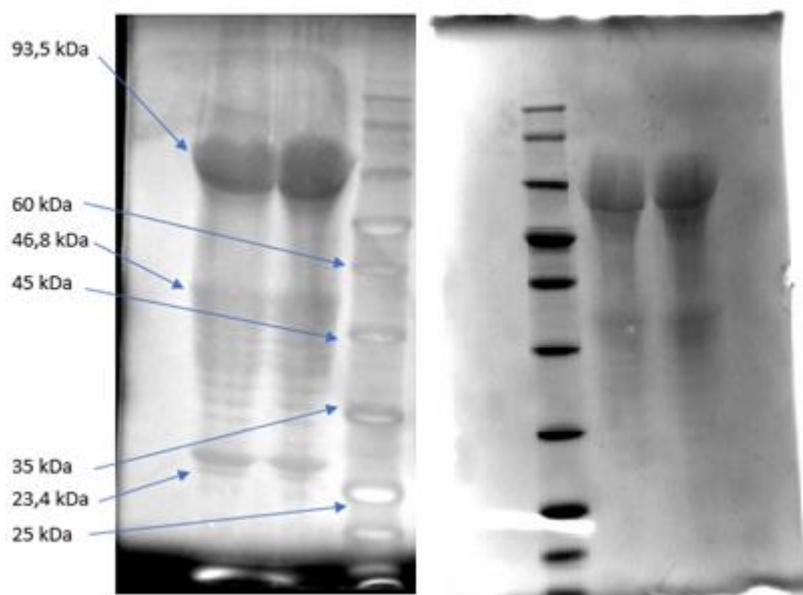


Figura 41. Electroforesis teñida en CuCl_2 (izquierda) y azul de Coomassie (derecha) de los Sbf1 anteriores.

De acuerdo a lo expuesto, se contempla en la electroforesis que las bandas que no se han podido teñir en azul de Coomassie si están presentes en CuCl_2 . Además, aparecen dos bandas más intensas por debajo de la del polímero: una asimilable a la mitad del peso molecular del mismo (46,8 kDa) y otra que corresponde a la cuarta parte del peso molecular del polímero (23,4 kDa). Esto parece indicar que no hay impurezas presentes en el mismo, sino que ha ocurrido una degradación del ELP, una por la mitad del tetrabloque (EI)-(EI) y otra por segmentación de los dibloques.

Una vez se concluye que el polímero está puro, se somete el sobrenadante obtenido a 3 ciclos de diálisis con 25 L de agua destilada y uno último de 25 L de agua Milli-Q con el fin de volver despreciable la concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ añadida.

La masa de $3\text{K}(\text{EI})_2$ tras congelarlo y liofilizarlo obtenida fue de 53,48 mg. Como la producción se realizó en 5 L, el rendimiento de la misma fue de 10,70 mg/L de medio, más bajo que los polímeros obtenidos anteriormente debido a que no fue una producción óptima.

5.3.2- Caracterización del biopolímero

5.3.2.1- Determinación de la masa molecular aparente por SDS-PAGE

Analizando por electroforesis una alícuota del $3\text{K}(\text{EI})_2$ al salir de dializar (Figura 42) para comprobar su pureza se determina que dicho ELP se ha obtenido puro, libre del resto de proteínas endógenas bacterianas. Utilizando dicha electroforesis, se realiza cálculo de la masa molecular aparente (Tabla 20 y Figura 43) construyendo una recta de calibrado con los valores de R_f y del logaritmo en base 10 de masas moleculares del marcador.

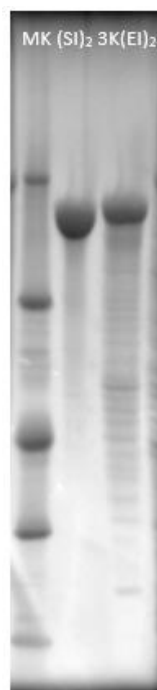


Figura 42. Electroforesis del 3K(EI)₂ post-diálisis.

M _m (kDa)	R _f	Log M _m
116,0	1,00	2,06
66,2	0,85	1,82
45,0	0,68	1,65
35,0	0,52	1,54
25,0	0,35	1,40
18,4	0,16	1,26
14,4	0,12	1,16

Tabla 20. Relación de R_f y M_m.

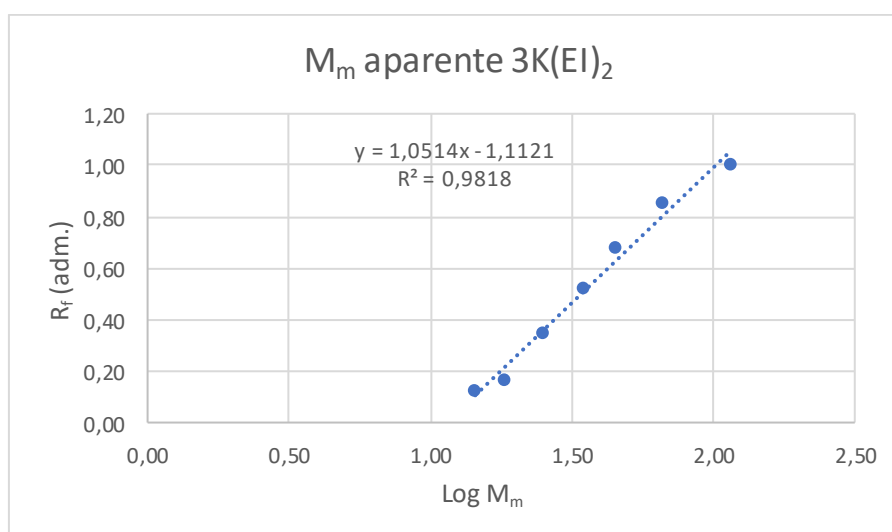


Figura 43. Representación de la Tabla 20.

Despejando la ecuación $R_f = 1,0514(\text{Log } M_m) - 1,1121$, se obtiene que la masa molecular aparente del 3K(EI)₂ es de 94,11 kDa (Tabla 21).

R _f	Log M _m	M _m (kDa) 3K(EI) ₂
0,96	1,97	94,11

Tabla 21. Cálculo de la M_m del 3K(EI)₂

Como se puede apreciar, el peso molecular aparente posee un valor superior a la masa molecular teórica de 93,5 kDa. Esto implica que polímero posee cierto retraso electroforético a causa de su carácter hidrofóbico.

5.3.2.2- Análisis de la composición por ¹H-RMN

Analizando el espectro de ¹H-RMN obtenido (*Anexo, apartado 8.1*) del polímero a una concentración de 16 mg/mL en DMSO deuterado, se comparan los resultados experimentales con los valores calculados teóricamente (Tabla 22):

Tipo de ¹ H	Teóricos	Experimentales
CH ₃ (~0,5-1 ppm)	2520	2520,00
CH ₂ y otros CH (~1-2 ppm)	1644	1716,14
CH _α (~3,5-4,5 ppm)	1983	1911,72
NH (peptídico) (~7-9 ppm)	886	823,61

Tabla 22. Clasificación de los protones del polímero 3K(EI)₂ para su identificación.

A la vista de los valores expuestos en la Tabla 22, si normalizamos la señal asociada a los grupos metilos del polímero, el resto de señales encontradas empíricamente no difieren significativamente de las previstas de manera teórica. Las ligeras variaciones encontradas se deben a la influencia que ejerce la estructura terciaria del polipéptido en el desplazamiento químico de sus protones, no siendo incluida en el cálculo teórico la influencia de los pentapéptidos entre sí. Además, la variación de los protones de los grupos amida pertenecientes al enlace peptídico se debe al ya comentado equilibrio entre la forma protonada y la forma neutra del grupo funcional, dependiente del pH. De nuevo, dicho cálculo no tuvo en cuenta la protonación de los grupos amida de la molécula al encontrarse la muestra en pH fisiológico.

Por lo tanto, se puede afirmar que los valores teóricos no difieren en gran medida de los encontrados experimentales, concluyendo que la composición química del polímero es la esperada.

5.3.2.3- Determinación de la masa molecular por MALDI-TOF

Los espectros obtenidos del polímero (*Anexo, apartado 8.4*) disuelto en DMSO a una concentración de 2 mg/mL mostraron la primera y la segunda ionización. La masa molecular experimental media del polímero respecto a la primera ionización es de 92579 Da. Comparándola con el valor teórico de 93500 Da, la diferencia respecto del mismo es de 921 Da.

Esto indica que los valores obtenidos para la masa molecular teórica, aparente y experimental del polímero son similares entre sí y, por lo tanto, el peso molecular del 3K(EI)₂ es el predicho.

5.3.2.4- Determinación de la temperatura de transición mediante DSC

Usando las condiciones descritas para el (SI)₂ y 3CK₂₄(SI)₂, se observó un punto de transición correspondiente a una T_t de 16,59°C. El resultado es lógico puesto que, a pesar de componerse

de un aminoácido huésped hidrofílico como es el glutámico, su bloque se encuentra flanqueado por pentapéptidos hidrofóbicos (VPGVG). Como consecuencia a esto, el carácter hidrofílico del polipéptido se ve reducido y, por lo tanto, su T_t no es elevada, cosa que hubiese ocurrido de haber portado un bloque análogo al de lisinas del $3CK_{24}(SI)_2$, pero con glutámicos.

5.3.2.5- Determinación de la composición aminoacídica mediante HPLC

La composición de los aminoácidos (Tabla 23) encontrada en el $3K(EI)_2$ es la siguiente:

Aminoácido	Valor teórico	Valor experimental
M	1	0,00
E	21	29,78
S	1	0,74
L	2	2,04
V	300	305,35
P	221	220,34
G	440	443,66
I	120	100,64
K	3	7,04
Total	1109	1109,60

Tabla 23. Composición aminoacídica del $3K(EI)_2$.

Según el número de aminoácidos expuesto en la Tabla 23, la composición total teórica del polímero coincide con la experimental, habiendo ligeras variaciones en la composición del polímero en la cantidad de glutámicos, lisinas, isoleucinas y metionina. La metionina perteneciente al bloque MESLLP introducido por la región de control del p10NKKK puede verse degradada una vez ha tenido lugar la traducción del polímero, siendo lógico no hallar ninguna en los valores experimentales.

Aun así, el número de aminoácidos del polímero hallados empíricamente no difieren significativamente de los teóricos, por lo que se concluye que la composición del $3K(EI)_2$ es la prevista.

6-Conclusiones

- Se consiguió la síntesis de los polímeros (SI)₂ y del 3CK₂₄(SI)₂, partiendo de sus correspondientes genes contenidos en un plásmido de expresión. El rendimiento obtenido en el segundo polipéptido supera al primero, en contraste con los resultados anteriores obtenidos por el grupo de investigación. El uso de una cepa bacteriana distinta a la empleada anteriormente o los cambios en las condiciones de producción podrían ser la razón de este aumento en el rendimiento.
- Se ha optimizado el protocolo de purificación por ITC del (SI)₂, permitiendo que salga prácticamente puro en el primer ciclo del mismo, lo cual permite reducir el coste de reactivos y el tiempo de su obtención. Sin embargo, queda por mejorar el del 3CK₂₄(SI)₂, pudiendo seguirse la vía que emplea β-mercaptoetanol como agente reductor para su extracción de los precipitados fríos.
- El nuevo protocolo de purificación alternativo parece viable para polímeros que no tienen una gran complejidad estructural como el 3K(EI)₂, siendo necesarias modificaciones para poder ser empleado en otros que sí la poseen, como el 3CK₂₄(SI)₂.
- Las técnicas empleadas para la caracterización de los polímeros (SDS-PAGE, ¹H-RMN, MALDI-TOF, DSC, DLS, análisis de aminoácidos) indican que estos poseen las composiciones y características esperadas de cada uno de ellos.
- Se ha comprobado la capacidad de formación de nanopartículas del (SI)₂ lo que permite utilizarlo para la encapsulación de fármacos en estudios posteriores.

7- Bibliografía

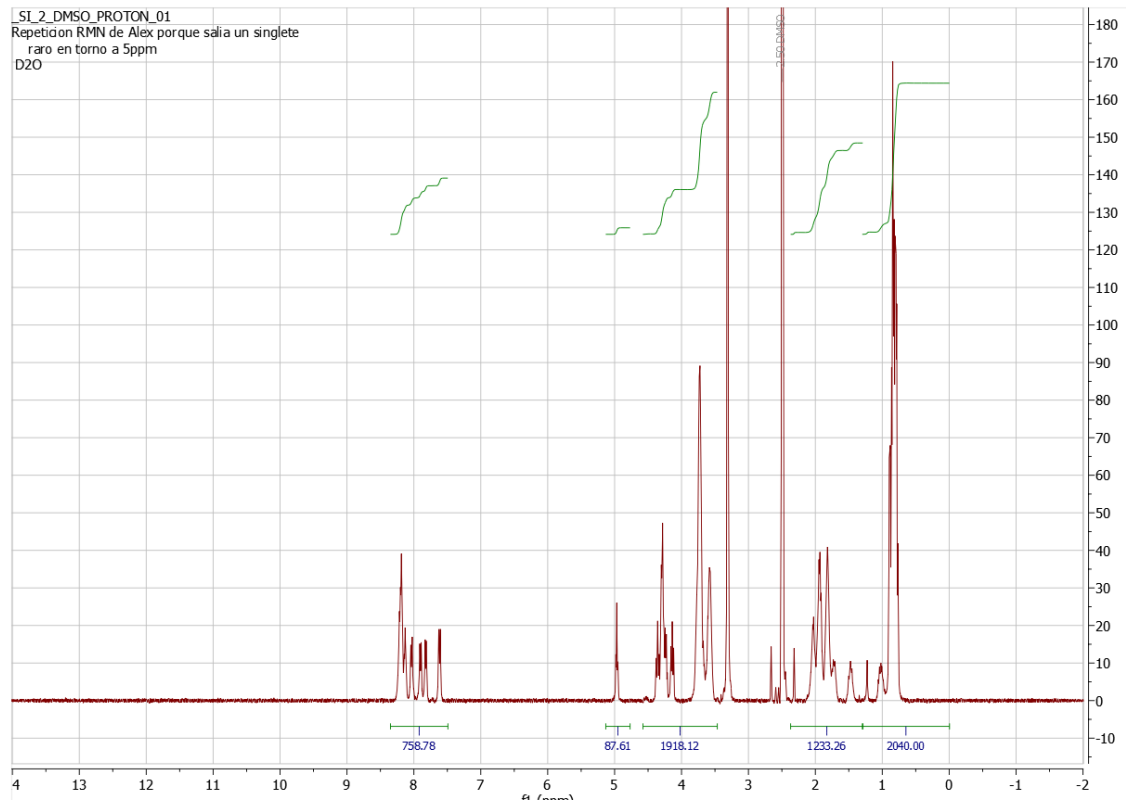
- 1- Bruce Alberts *et al.* (2014) *Molecular Biology of the Cell*. 6th edn.
- 2- Jocelyn E. Krebs, Elliott S. Goldstein and Stephen T. Kilpatrick (2018) “Methods in Molecular Biology and Genetic Engineering,” in *Lewin’s Genes XIII*. 12th edn.
- 3- Vert, M. *et al.* (2012) “Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012),” *Pure and Applied Chemistry*, 84(2). doi: 10.1351/PAC-REC-10-12-04.
- 4- Langer, R., & Tirrell, D. A. (2004). Designing materials for biology and medicine. *Nature*, 428(6982). <https://doi.org/10.1038/nature02388>
- 5- Varanko, A., Saha, S. and Chilkoti, A. (2020) “Recent trends in protein and peptide-based biomaterials for advanced drug delivery,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, 156. doi: 10.1016/j.addr.2020.08.008.
- 6- Moore, J. and Thibeault, S. (2012) “Insights Into the Role of Elastin in Vocal Fold Health and Disease,” *Journal of Voice*, 26(3). doi: 10.1016/j.jvoice.2011.05.003.
- 7- Arias, F. J. *et al.* (2011) “Los polímeros tipo elastina y su utilización como tags para la purificación de proteínas,” *Biomecánica*, 19(1), pp. 8–16. doi: 10.5821/sibb.v19i1.1811.
- 8- MacEwan, S. R., Hassouneh, W. and Chilkoti, A. (2014) “Non-chromatographic Purification of Recombinant Elastin-like Polypeptides and their Fusions with Peptides and Proteins from *Escherichia coli*” *Journal of Visualized Experiments*, (88). doi: 10.3791/51583.
- 9- Li, N. K. *et al.* (2018) “Sequence Directionality Dramatically Affects LCST Behavior of Elastin-Like Polypeptides,” *Biomacromolecules*, 19(7). doi: 10.1021/acs.biomac.8b00099.
- 10- Le, D. H. T. and Sugawara-Narutaki, A. (2019) “Elastin-like polypeptides as building motifs toward designing functional nanobiomaterials,” *Molecular Systems Design & Engineering*, 4(3). doi: 10.1039/C9ME00002J.
- 11- Alessandra Girotti (2007) Tesis: “Desarrollo de una plataforma biotecnológica para la obtención de polímeros recombinantes tipo elastina”.
- 12- Irene Alonso Sampedro (2018) TFM: “Diseño, producción y caracterización de nuevos polímeros recombinantes tipo elastina para la encapsulación de fármacos”.
- 13- G-Biosciences *GET™ Plasmid DNA 96-Well*.
- 14- Davis, L. G., Dibner, M. D. and Battey, J. F. (1986) “Agarose Gel Electrophoresis,” in *Basic Methods in Molecular Biology*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-444-01082-7.50022-9.
- 15- Bitesize Bio (2008) *Agarose Gels Do Not Polymerise!*
- 16- Orbit Biotech *Bacterial Growth Curve*.
- 17- Sweet, C. *et al.* (2021) “Development of a Fast Organic Extraction–Precipitation Method for Improved Purification of Elastin-Like Polypeptides That Is Independent of Sequence and Molecular Weight,” *Biomacromolecules*, 22(5). doi: 10.1021/acs.biomac.1c00096.
- 18- Skoog, D. A., Holler, Fj. and Crouch, S. R. (2008a) *Principios de análisis instrumental*. 6th edn págs 559-560.
- 19- Skoog, D. A., Holler, Fj. and Crouch, S. R. (2008a) *Principios de análisis instrumental*. 6th edn Capítulo 19.

- 20- Skoog, D. A., Holler, Fj. and Crouch, S. R. (2008a) *Principios de análisis instrumental*. 6th edn págs 762, 816.
- 21- Choudhary, R. C. *et al.* (2019) "Characterization Methods for Chitosan-Based Nanomaterials," in. doi: 10.1007/978-3-030-12496-0_5.
- 22- Skoog, D. A., Holler, Fj. and Crouch, S. R. (2008a) *Principios de análisis instrumental*. 6th edn págs 955-957.
- 23- Skoog, D. A., Holler, Fj. and Crouch, S. R. (2008b) *Principios de análisis instrumental*. 6th edn págs 900-901.

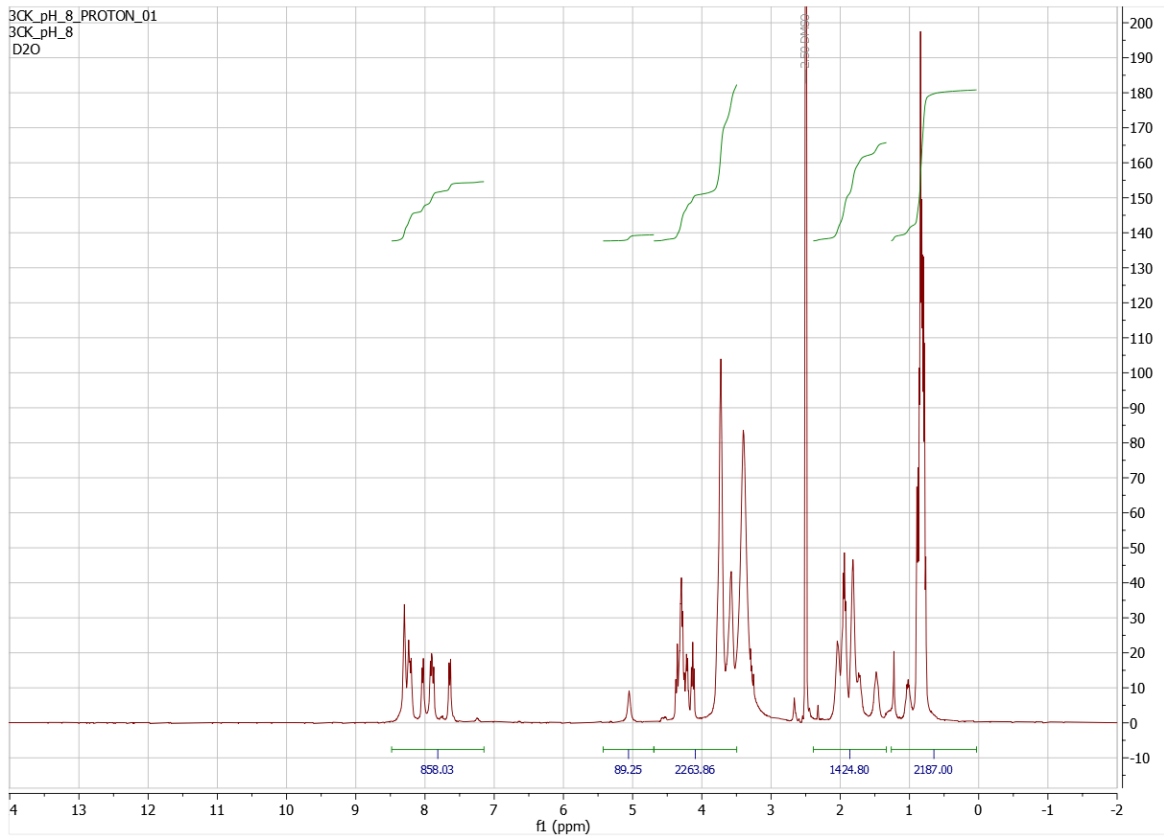
8-Anexo

8.1- Espectros de ^1H -RMN

a)



b)



c)

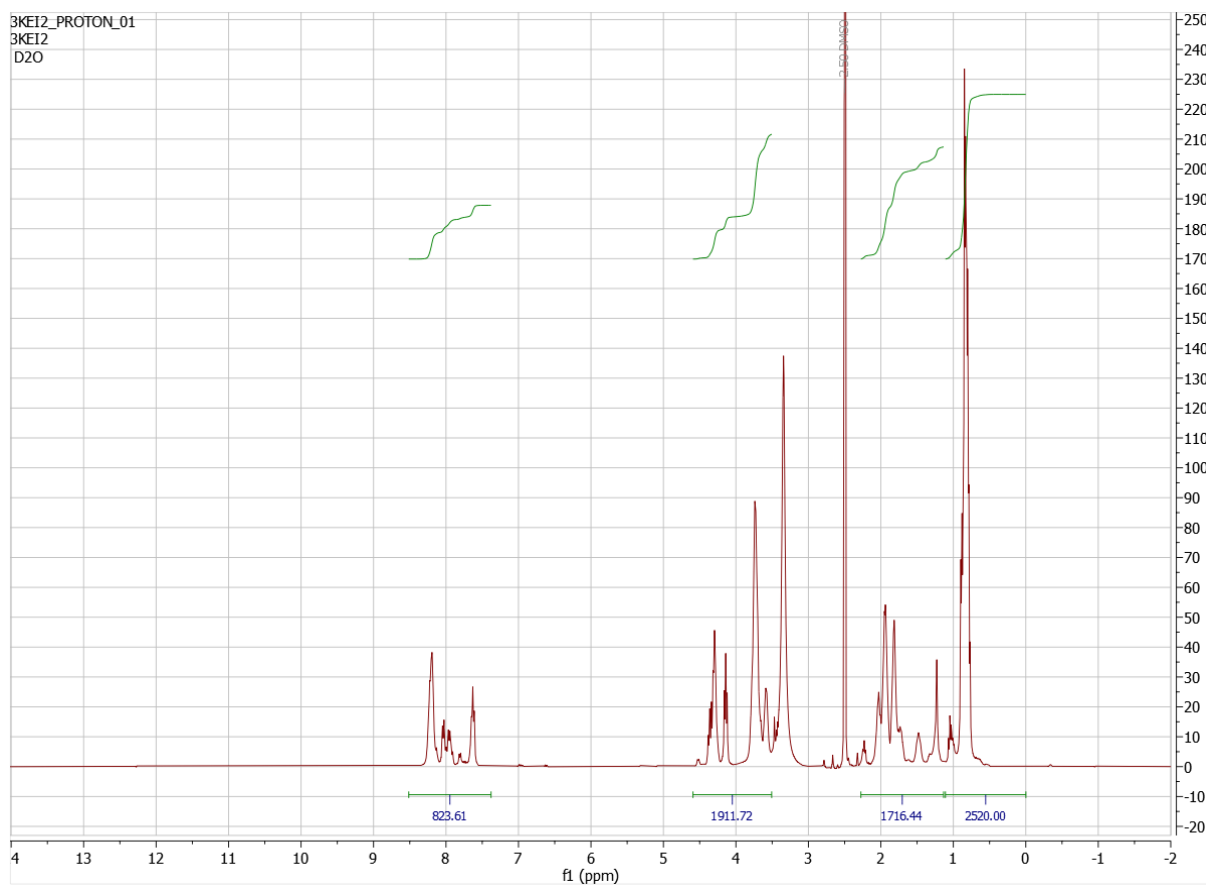
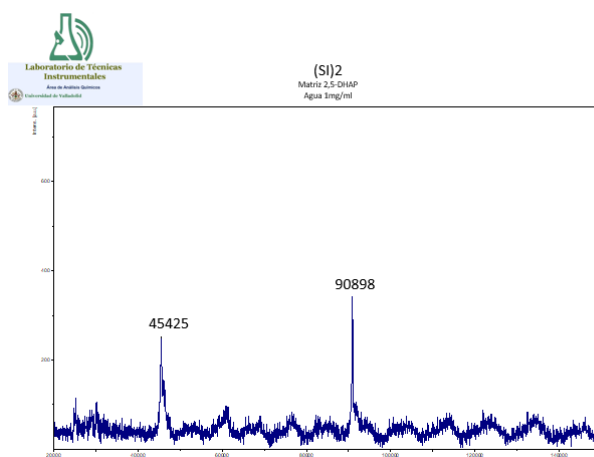
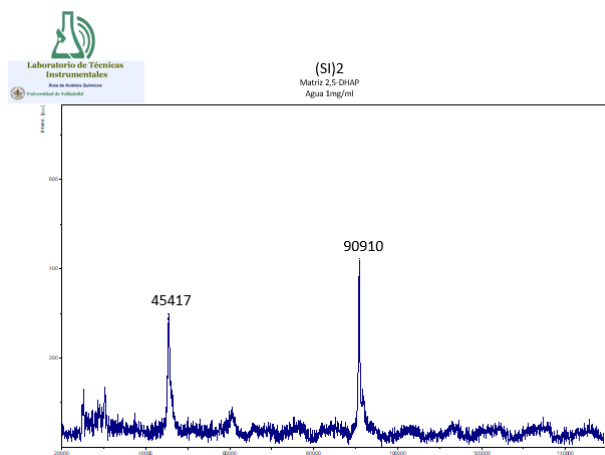
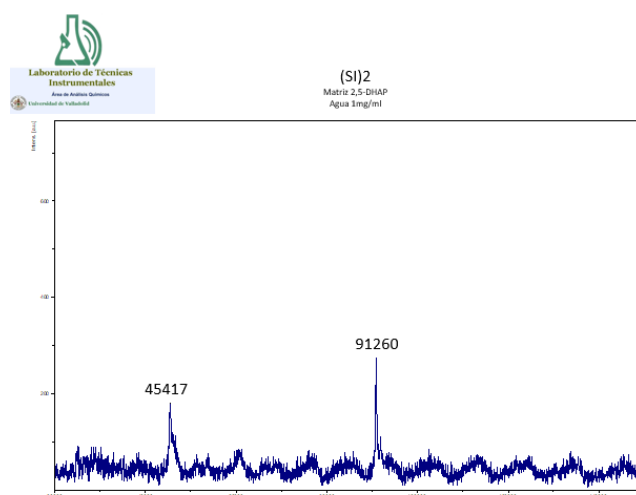
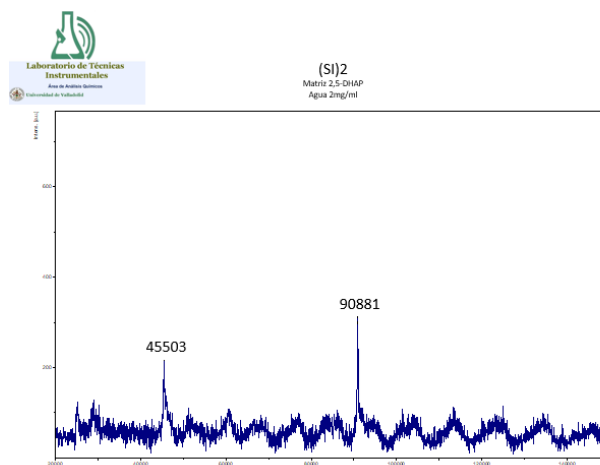
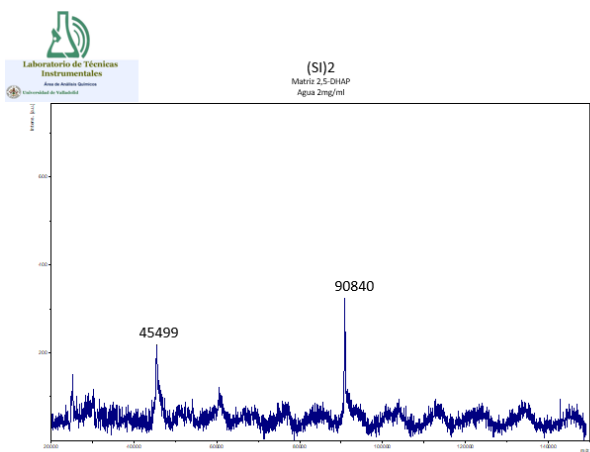


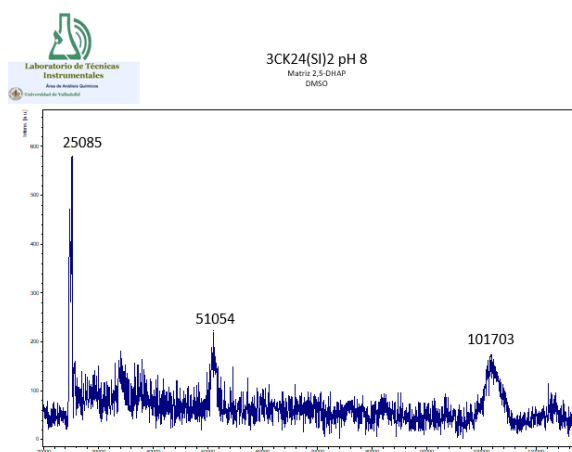
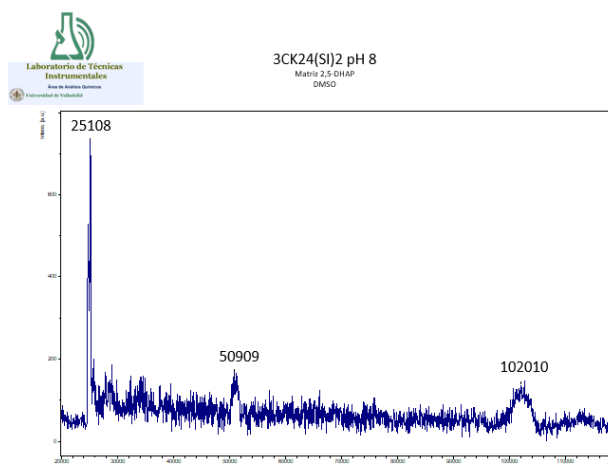
Figura A.1. Espectros de protón de a) $(SI)_2$ b) $3CK_{24}(SI)_2$ c) $3K(EI)_2$.

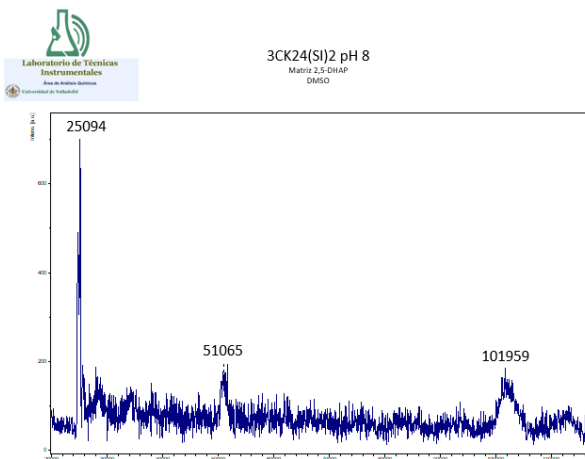
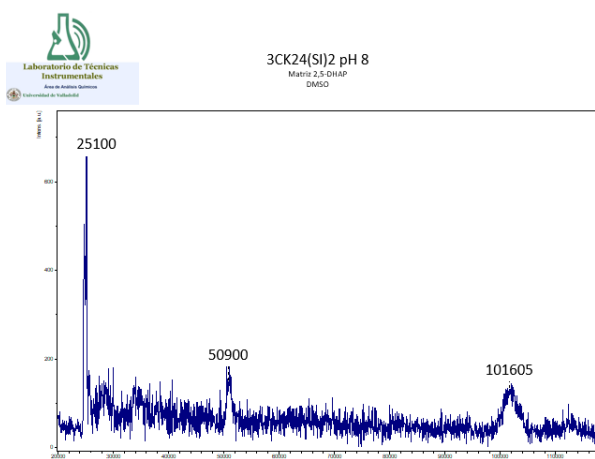
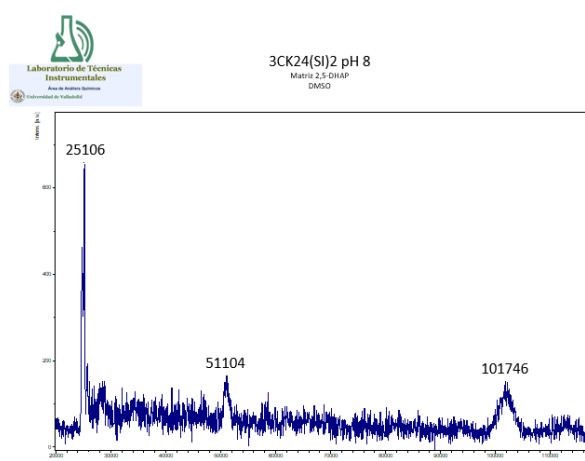
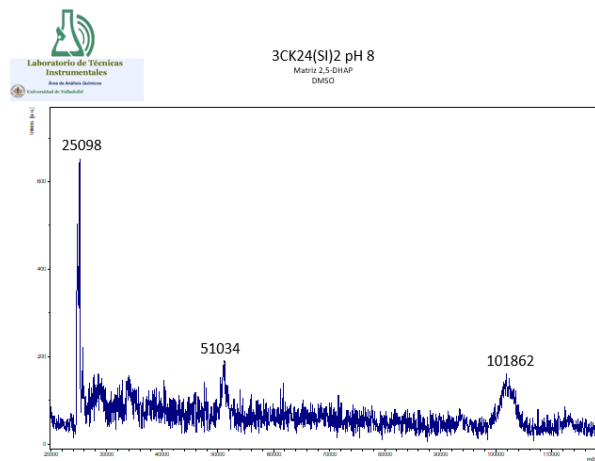
8.2- MALDI-TOF del $(SI)_2$



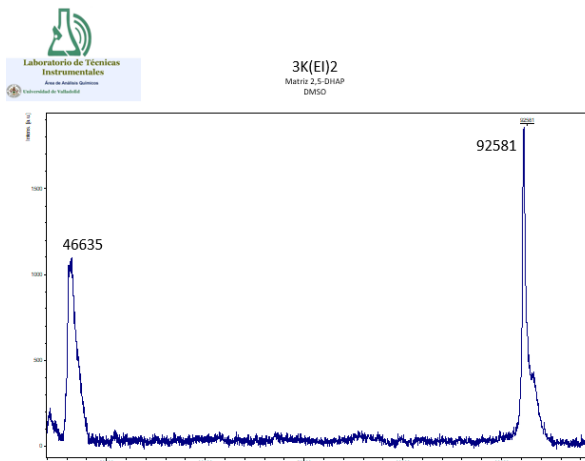
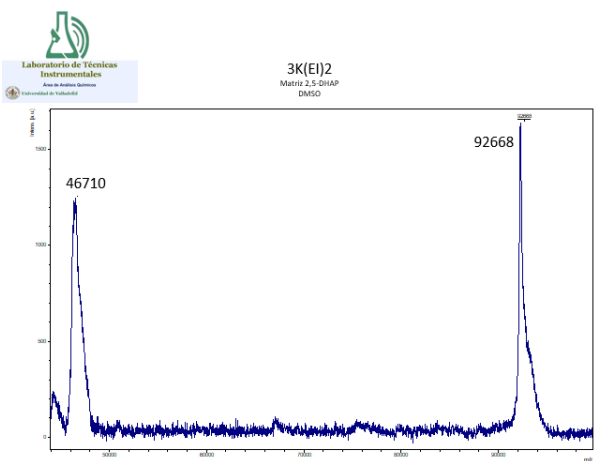


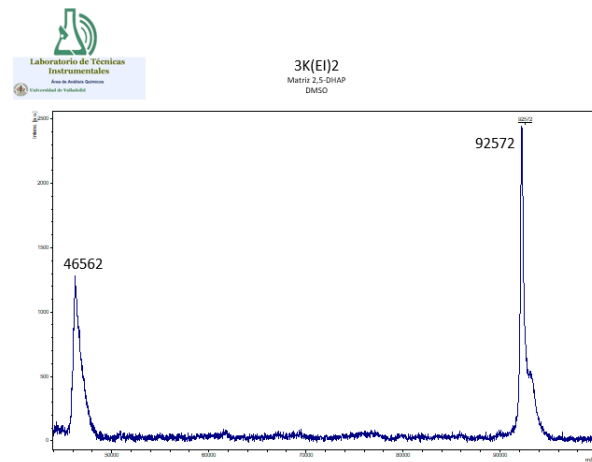
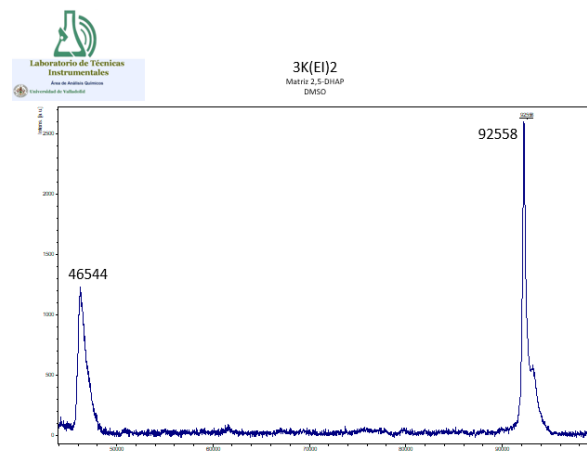
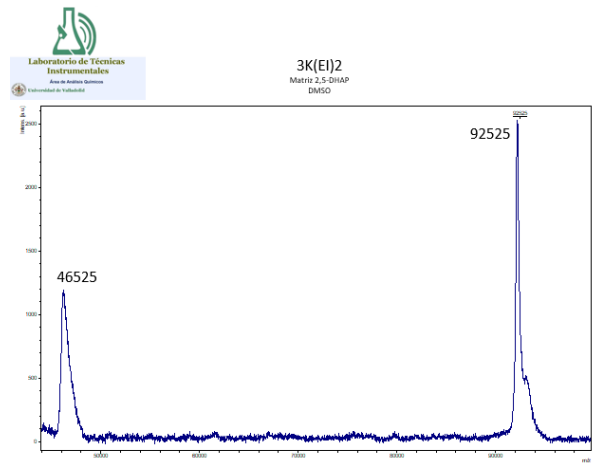
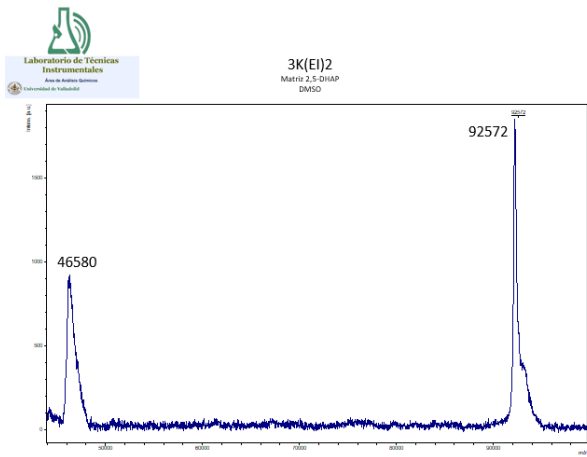
8.3- MALDI-TOF del $3CK_{24}(SI)_2$





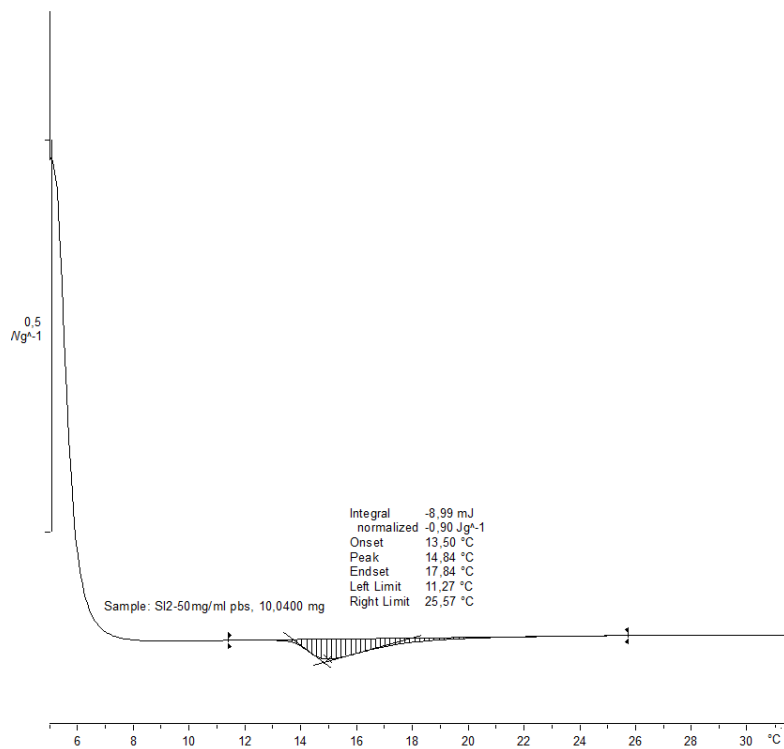
8.4- MALDI-TOF del 3K(EI)₂



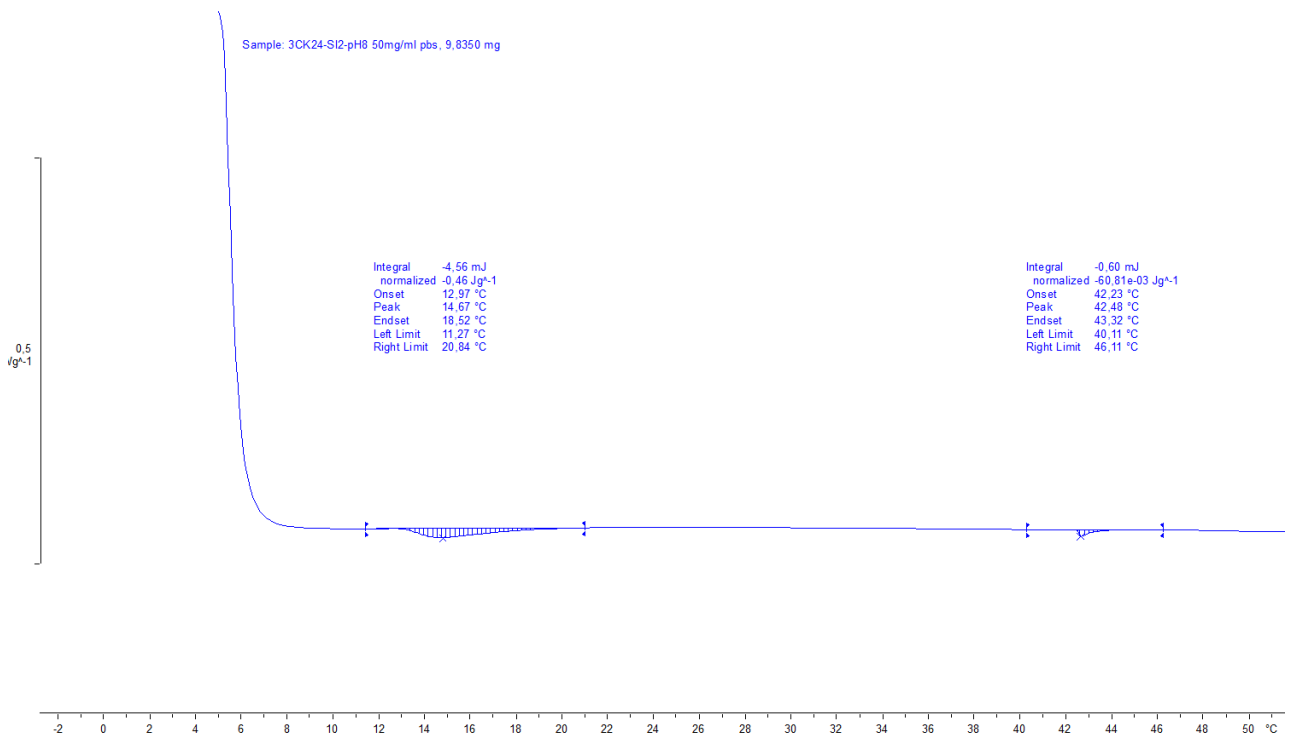


8.5- Termogramas obtenidos por DSC

a)



b)



c)

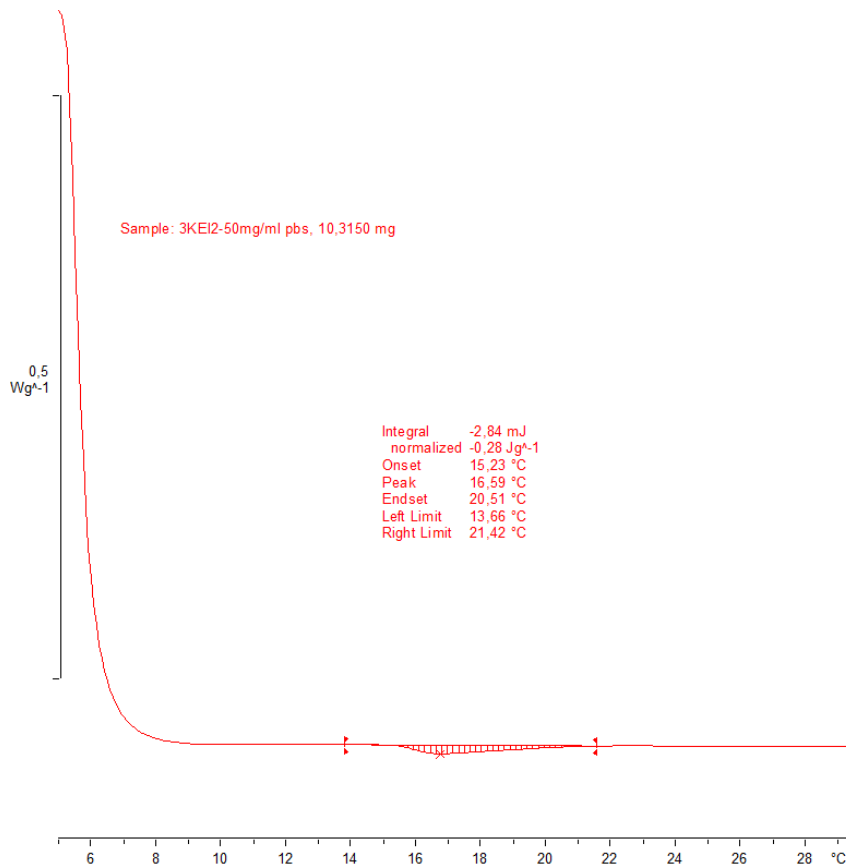


Figura A.2. Termogramas del a) $(SI)_2$ b) $3CK_{24}(SI)_2$ c) $3K(EI)_2$.

8.6- Abreviaturas

Abreviatura	Nombre completo	Abreviatura	Nombre completo
¹ H-RMN	Resonancia magnética nuclear de protón	LBIndc.	LB de autoinducción
A/Abs	Absorbancia	LTI	Laboratorio de técnicas instrumentales
Adm.	Adimensional	M	Metionina
C	Cisteína	MALDI-TOF	Desorción/Ionización por Láser Asistida por Matriz con detector de tiempo de vuelo
CD	Con deflectores	MK	Marcador o <i>marker</i>
Cfu	Unidad formadora de colonias	M _m /P _m	Masa/peso molecular
CMC	Concentración crítica de micelar	Milli-Q	Agua ultrapura Milli-Q
CMT	Temperatura crítica micelar	mTB/TB	<i>Modified Terrific Broth</i>
Col	Colonia	OD ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
Conc.	Concentración	P	Prolina
Δ	Caliente (referencia a la fase)	p/v	Peso/volumen
ddNTP	Didesoxinucleótido trifosfato	p10N3C	pET10NCCC
DLS	Dispersión dinámica de la luz	p10N3K	pET10NKKK
DSC	Calorimetría diferencial de barrido	p7	pET7
E	Ácido glutámico	Pb	Pares de bases
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	PDI	índice de Polidispersidad
El.	Elución	Pr./↓/Pt.	Precipitado
ELP	Polipéptido tipo elastina	rADN	ADN recombinante
F	Frío (referencia a la fase)	Rpm	Revoluciones por minuto
G	Glicina	S	Serina
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia	S.O.C. Medium	Medio de caldo superóptimo con represión por catabolito
I	Isoleucina	Sb.	Sobrenadante
I:M	Isopropanol/metanol 1:1	SD	Sin deflectores
IBGM	Instituto de biología y genética molecular	SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico
Inoc.	Inóculo	SPME	Microextracción en fase sólida
Iso	Isopropanol	T _t	Temperatura de transición
ITC	Ciclos de transición inversa	Ultra.	Ultrasonidos
K	Lisina	UVa	Universidad de Valladolid
L	Leucina	V	Valina
LB	<i>Lysogeny Broth</i>	v/v	Volumen/volumen
LB+TB	Mezcla de 1/3 de medio LB y 2/3 de medio TB	ZP	Potencial zeta