



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

Síntesis y caracterización de polímeros recombinantes para terapias génicas dirigidas

Autora: Mónica Queipo Riera

*Tutor/es: Dr. Francisco Javier Arias Vallejo
Dra. Alessandra Girotti*

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de este trabajo, así como las que me han apoyado para sacarlo adelante durante todos estos meses.

Gracias a mis tutores, Javier y Alessandra, por los consejos y las respuestas a todas mis preguntas, así como la ayuda prestada y los conocimientos que he adquirido sobre un campo fascinante del que sabía muy poco.

Gracias a Sara por ser mi red y mi apoyo, por la cantidad de horas dedicadas a ayudarme, y por ser como una hermana en la ciencia durante todos estos meses. A Irene, por las traducciones “química-biología” en las primeras semanas, y por tantos consejos de cara al futuro que tanto me han servido y servirán. A Sandra, por estar dispuesta ayudarme en cualquier momento y situación con tanto cariño sin pedir nada a cambio. Y a Alejandro, por amenizar estos meses y compartir conmigo nuestra primera experiencia en esta rama.

Y, por supuesto, gracias a mi familia y mis amigos por todo el apoyo día a día, la comprensión y los ánimos incansables. Haber llegado hasta aquí es gracias a vosotros.

ÍNDICE

1.	RESUMEN	5
2.	INTRODUCCIÓN	6
2.1.	INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOMATERIALES	6
2.2.	CLONACIÓN GÉNICA	7
2.2.1.	Herramientas enzimáticas para la clonación	8
2.3.	ELASTINA	9
2.3.1.	Polímeros tipo elastina (ELP)	9
2.3.2.	Polímeros recombinantes tipo elastina (ELR)	10
2.4.	POLIPLEXOS	11
2.5.	APLICACIONES BIOMÉDICAS DE LOS POLIPLEXOS CON ELRs: CÁNCER.....	12
2.5.1.	Fragmento scFv: direccionamiento.....	12
3.	OBJETIVOS	14
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
4.1.	MATERIALES	15
4.1.1.	Reactivos químicos	15
4.1.2.	Disoluciones tamponadas.....	15
4.1.3.	Disoluciones de teñido	16
4.1.4.	Materiales de biología molecular	16
4.1.5.	Vectores plasmídicos.....	18
4.1.6.	Plásmidos empleados para la introducción de insertos.....	19
4.1.7.	Enzimas.....	21
4.1.8.	Kits para el tratamiento de DNA	22
4.2.	MÉTODOS	22
4.2.1.	Electroforesis en gel	22
4.2.2.	Digestión de DNA mediante enzimas de restricción	26
4.2.3.	Defosforilación de DNA	26
4.2.4.	Reacción de ligación de DNA en el proceso de clonación	27
4.2.5.	Transformación en cepas bacterianas	27
4.2.6.	Crecimiento de bacterias en medio líquido	29
4.2.7.	Purificación de DNA plasmídico.....	29
4.2.8.	Identificación y análisis de los fragmentos de DNA	31
4.2.9.	Determinación de la concentración y la pureza de los fragmentos de DNA	32
4.2.10.	Secuenciación del DNA	32
4.2.11.	Preparación de muestras para electroforesis SDS-PAGE	33

4.2.12.	Bioproducción de polímeros recombinantes	34
4.2.13.	Purificación de polímeros recombinantes	36
4.2.14.	Caracterización físico-química de polímeros recombinantes	38
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
5.1.	CONSTRUCCIÓN DEL GEN pET7-scFv(EpCAM)-VOK-H6.....	41
5.2.	Descripción de la construcción del gen pET7-scFv(EpCAM)-VOK-H6.....	42
5.2.1.	Síntesis experimental del gen pET7-scFv(EpCAM)-VOK-H6	43
5.3.	BIOPRODUCCIÓN DE ELR.....	49
5.3.1.	Optimización de la bioproducción del recombinámero P12VOKH6.....	49
5.3.2.	Bioproducción del polímero recombinante	50
5.3.3.	Purificación del polímero recombinante P12VOKH6	51
5.4.	CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE ELR	53
5.4.1.	FT-IR.....	53
5.4.2.	Espectrometría de masas: MALDI-TOF	54
5.4.3.	Cromatografía de exclusión molecular en columna.....	55
5.4.4.	Espectroscopía DLS (Dynamic light scattering)	56
5.4.5.	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)	57
5.4.6.	Análisis de aminoácidos por HPLC	58
6.	CONCLUSIONES.....	59
7.	PERSPECTIVAS DE FUTURO.....	59
8.	BIBLIOGRAFÍA	60
9.	ABREVIATURAS	62
ANEXO I	64	

1. RESUMEN

La elastina, por sus propiedades elásticas y resistentes, es una de las proteínas naturales de mayor interés en la ciencia de los biomateriales. El análisis de su estructura reveló una relación entre dicha estructura y las cualidades físico-químicas de la molécula, lo que despertó el interés por la síntesis de polímeros recombinantes tipo elastina (ELR) obtenidos mediante ingeniería genética. Estos biopolímeros, caracterizados por su biocompatibilidad, son excelentes candidatos para llevar a cabo numerosas funciones como biomateriales en el campo de la Biomedicina.

En este trabajo se ha diseñado, utilizando técnicas de Ingeniería genética, un nuevo gen recombinante que codifica para el polímero tipo elastina scFv(EpCAM)-VOK-H6, que podrá ser bioproducido en trabajos posteriores para estudiar su potencial como biomaterial en aplicaciones biomédicas. Para su síntesis, se han utilizado diferentes cepas de la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) por su sencilla maquinaria de replicación y traducción de DNA. Por otra parte, se ha sintetizado y purificado el recombinámero tipo elastina scFv(P12)-VOK-H6 (también nombrado P12VOKH6), cuya estructura permite la formación de poliplexos estables capaces de albergar moléculas de DNA plasmídico terapéutico. Este polímero, por lo tanto, tiene un excelente potencial como biomaterial en aplicaciones biomédicas, en concreto en terapias anticancerígenas dirigidas. El mencionado polímero se ha caracterizado físico-químicamente mediante diferentes técnicas: electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), espectroscopía de infrarrojo (FT-IR), espectrometría de masas (MALDI-TOF), dispersión dinámica de la luz (DLS), cromatografía en fase sólida de exclusión por tamaños, resonancia magnética nuclear (RMN) y análisis de aminoácidos por HPLC.

ABSTRACT

Elastin, due to its elastic and resistant properties, is one of the natural proteins of greatest interest in biomaterials science. Analysis of its structure revealed a correlation between this structure and the physicochemical properties of the molecule, which sparked interest in the synthesis of genetically engineered elastin-like recombinant polymers (ELR). These biopolymers, characterized by their biocompatibility, are excellent candidates to perform numerous functions as biomaterials in the field of biomedicine.

In this project a new recombinant gene encoding for the elastin-like polymer scFv(EpCAM)-VOK-H6 was designed using genetic engineering techniques. This polymer can be bioproduced in subsequent work to study its potential as a biomaterial in biomedical applications. For its synthesis, different strains of *E. coli* bacteria were used due to their simple DNA replication and translation machinery. Moreover, the elastin-like recombinamer scFv(P12)-VOK-H6 (also named P12VOKH6), whose structure allows the formation of stable polyplexes capable of harboring therapeutic plasmid DNA molecules, was synthesized and purified. This polymer, therefore, has excellent potential as a biomaterial in biomedical applications, especially in targeted anticancer therapies. The polymer has been physico-chemically characterized by different techniques: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), Fourier transform infrared (FT-IR), mass spectrometry (MALDI-TOF), dynamic light scattering spectroscopy (DLS), nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and amino acid analysis by HPLC.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOMATERIALES

La genética molecular, como una contribución importante en el ámbito de la biología molecular, se basa en el “Dogma central de la genética molecular” introducido por Francis Crick (Figura 1), que describe el proceso por el cual la información genética contenida en la secuencia de DNA sufre un proceso de transcripción para dar lugar al RNA que, a su vez, se somete a un proceso de traducción que da lugar a las proteínas. De este modo, cada uno de estos tres elementos aporta la información necesaria para la síntesis del siguiente¹.

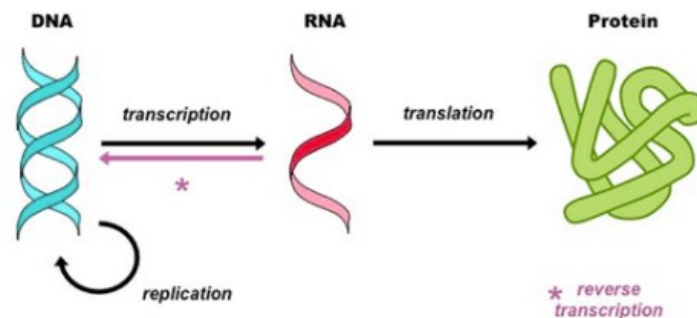


Figura 1. Representación esquemática del Dogma central de la genética molecular

Por su parte, la **Ingeniería genética** puede entenderse como el proceso de la utilización de la tecnología del DNA recombinante (rDNA) para alterar la composición genética de un organismo. Dicha tecnología ha evolucionado a un campo enorme donde es posible clonar genomas, modificarlos y transmitirlos de una célula a otra², utilizando técnicas abarcadas por todas las ramas mencionadas.

El acercamiento entre las diferentes ramas implicadas en el estudio de la biología molecular ha permitido que investigadores de muchas áreas biológico-médicas hayan basado sus estudios en el DNA recombinante. Esto ha derivado en la aparición de áreas de conocimiento como la biomedicina y la ciencia de los materiales para aplicaciones biomédicas, cuya contribución a la medicina actual es cada vez mayor gracias a los avances científicos en terapias génicas, entendidas como el uso de la ingeniería genética para tratar o diagnosticar enfermedades³.

Los **Biomateriales** se definen como sustancias naturales o sintéticas no farmacológicas que pueden ser utilizadas en el campo de la biomedicina pretendiendo observar, curar, mejorar o reemplazar un órgano, tejido o función mediante su uso como implantes, medios terapéuticos, dispositivos diagnósticos⁴, etc. Por lo tanto, una de las características más importantes que deben poseer estos biomateriales es la biocompatibilidad, es decir, su estructura y propiedades físico-químicas deben permitirle llevar a cabo sus funciones sin afectar negativamente al organismo⁵. Ello implica que no sean tóxicos ni causen rechazo por el sistema inmune, que sean estables químicamente, que sus productos de degradación sean bioinertes y que posean buenas características mecánicas⁶.

Una aplicación muy importante en este campo es el estudio de polímeros que puedan ser utilizados como vehículos en terapias génicas dirigidas. Los polímeros son compuestos químicos, naturales o sintéticos, formados por polimerización y que consisten, esencialmente, en unidades estructurales repetidas llamadas monómeros⁷. La combinación de diferentes polímeros puede llegar a ser muy útil a la hora de desarrollar biomateriales que realicen funciones específicas sin interferir con otras funciones del organismo. Entre los polímeros de nueva generación encontramos los proteicos, que se inspiran en las proteínas naturales, y pueden utilizarse para aplicaciones biomédicas.

2.2. CLONACIÓN GÉNICA

La síntesis de biopolímeros que puedan ser utilizados como biomateriales para aplicaciones biomédicas debe diseñarse de forma cuidadosa. Un método prometedor de síntesis que está adquiriendo gran importancia es la biosíntesis, es decir, el empleo de microorganismos como biorreactores que utilicen material genético recombinante para obtener los productos deseados. Este proceso se lleva a cabo partiendo de la clonación génica.

Se define como **Clonación génica** a la técnica de ingeniería genética por la cual se obtienen clones idénticos de determinado gen. En el caso de este trabajo, el objetivo es producir grandes cantidades de un polímero para formar posteriormente un polímero (apartado 2.4.). El proceso comienza por la identificación del gen a aislar, que se extrae del cromosoma en el que se encuentra mediante digestión enzimática, se aísla y se purifica.

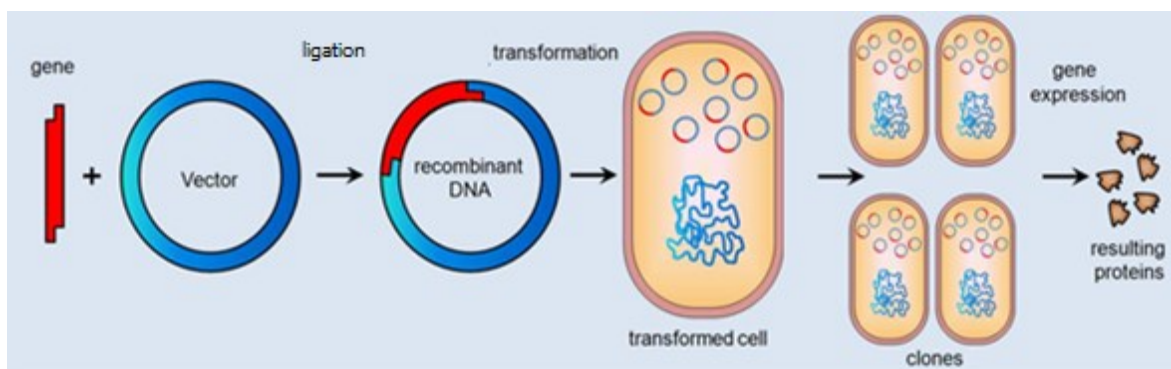


Figura 2. Representación esquemática de las etapas que constituyen el proceso de clonación de material genético.

El gen aislado (representado en rojo, Figura 2⁸) debe unirse a un sistema vectorial que actuará como transportador de ese DNA, proceso conocido como ligación (Figura 2). En este caso, como **vector** se utiliza un plásmido **de clonación** (representado en azul, Figura 2), cuya función es favorecer la síntesis de gran cantidad de copias del gen de interés. Los plásmidos son moléculas de DNA circular de doble hebra que se encuentran naturalmente en el citosol de las bacterias. Estos son muy utilizados en ingeniería genética por su pequeño tamaño, por ser fáciles de aislar, manipular y caracterizar, y por poseer una secuencia y mapa de restricción conocidos.

Obtenida la molécula de DNA recombinante compuesta por el vector plasmídico y el inserto génico, se debe introducir en una célula huésped mediante el proceso conocido como transformación (Figura 2) y su cultivo en el medio adecuado. Esta célula huésped es la que actúa como biorreactor y amplifica selectivamente el gen de interés mediante la producción de gran cantidad de copias del gen. Finalmente se debe realizar una segunda clonación del inserto génico en un vector plasmídico diferente, llamado **vector de expresión**, seguida de una segunda transformación. La función del mencionado vector es favorecer la producción, por parte de la célula huésped, del polímero recombinante codificado por la secuencia génica. Las transformaciones pueden llevarse a cabo en distintos tipos de células huésped, dependiendo de sus características y las necesidades del proceso. En este caso se realizan transformaciones bacterianas debido a su facilidad para multiplicarse e incubarse, su sencillez y el amplio conocimiento de su genética.

2.2.1. Herramientas enzimáticas para la clonación

Se puede afirmar que la tecnología del DNA recombinante se basa en la enzimología de los ácidos nucleicos. Los fragmentos de DNA que se utilizan en una clonación deben haber sido extraídos previamente de otro vector o de un cromosoma. Deben ser unidos a otros vectores durante los procesos de ligación, y ser fragmentados en los procesos de digestión. Además, son necesarios pasos intermedios de modificación de los extremos de las secuencias con el fin de favorecer las reacciones posteriores. Es decir, se requieren sistemas con una especificidad muy elevada para desempeñar estas tareas de corte y unión, cruciales en el proceso de clonación. Esta función la llevan a cabo las enzimas de restricción y de modificación como ligasas o fosfatasas.

Las enzimas de restricción se denominan también endonucleasas, porque digieren secuencias internas a la cadena del DNA. Su función es cortar el DNA de doble cadena al reconocer un patrón de secuencia específico llamado secuencia diana, generando los llamados fragmentos de restricción. Las diferentes enzimas de restricción se agrupan de acuerdo con sus propiedades de reconocimiento y corte: las de tipo I y tipo III reconocen secuencias específicas pero cortan la cadena a distancias variables de las mismas; las de tipo II reconocen secuencias palindrómicas específicas y cortan siempre en el mismo punto de las mismas; las de tipo IIS son similares a las de tipo II pero las secuencias que reconocen no son palindrómicas; y las de tipo IV solo digieren cadenas de DNA modificado (por ejemplo, metilado).

Se nombran con tres letras que hacen referencia al género y especie de la bacteria de la que se aislaron originalmente (por ejemplo *EcoRI* de *Escherichia coli*), seguidas a veces por una letra más que identifica el serotipo (variante antigénica de la bacteria), y un número romano que identifica la especificidad de la variante en el caso de que no sea la primera enzima aislada de dicha variante. Es importante elegir correctamente las enzimas a utilizar a la hora de digerir fragmentos génicos en cuanto a los extremos que generan en el corte, de manera que los fragmentos que se pretendan unir posteriormente posean extremos que sean compatibles para la unión. Las enzimas pueden

cortar la doble hebra generando extremos cohesivos, que dejan de dos a cuatro nucleótidos desapareados en cada extremo; o extremos romos, que no dejan bases desapareadas en los extremos ya que cortan en el centro del palíndromo (Figura 3).



*Sma*I extremos romos

*Eco*RI extremos cohesivos

Figura 3. Representación de enzimas (*Sma*I y *Eco*RI) que generan extremos romos y cohesivos, respectivamente, en la digestión de una secuencia de nucleótidos.

2.3. ELASTINA

La elastina (del griego elast(o)- que significa “golpeado”, “dúctil”; e -in(a) que significa “sustancia”) es una proteína natural de la familia de las holoproteínas (ya que contiene solamente aminoácidos) que se localiza en la matriz extracelular del tejido conjuntivo de los vertebrados aportando elasticidad y resistencia. Abunda en tejidos como la piel, los pulmones, las arterias principales o el útero⁹.

Han sido descritas varias secuencias repetitivas de aminoácidos como estructura primaria, siendo la más frecuente en la elastina el pentapéptido de secuencia Valina-Prolina-Glicina-Valina-Glicina (comúnmente expresado como VPGVG)¹⁰. La estructura de la proteína nativa se forma gracias a los entrecruzamientos formados entre las lisinas de la tropoelastina, su precursor soluble. La reticulación de la tropoelastina se inicia gracias a la acción de la enzima lisil oxidasa (LOX), y el proceso por el cual se forman las fibras elásticas de elastina a partir de su precursor es complejo y requiere la coordinación de numerosos mecanismos celulares¹¹. Las soluciones de tropoelastina se autoagregan al aumentar la temperatura, proceso conocido como coacervación, y se ha demostrado que este proceso está impulsado por el autoensamblaje en el medio extracelular de los dominios hidrofóbicos⁹, que ocurre de forma reversible. Este hecho, no solo confiere a la elastina una elevada elasticidad y durabilidad, sino que hace que los polímeros tipo elastina o ELPs (*elastin like polymers*) sean adecuados para su aplicación como biomateriales.

2.3.1. Polímeros tipo elastina (ELP)

Como se ha mencionado, los polímeros tipo elastina o *elastin-like-polymers* (ELPs) son polímeros polipentapeptídicos cuya secuencia de aminoácidos está basada en la de la elastina natural. Su composición en aminoácidos más común está formada por la repetición del pentapéptido (VPGXG)_n, donde X es cualquier aminoácido menos prolina. Se ha demostrado que el polipentapéptido (VPGPG)_n en el que la prolina (P) ocupa la cuarta posición desestabiliza la estructura secundaria impidiendo el correcto plegamiento necesario para formar la estructura cuaternaria y, por tanto, neutralizando las propiedades de interés del polímero¹².

Según las investigaciones de D. W. Urry acerca de este tipo de polímeros, los ELPs experimentan una transición inversa desde un estado de mayor a menor desorden al aumentar la temperatura.

Esto es, son solubles en agua por debajo de 25°C, y pasan a un estado viscoso y elástico por encima de esta temperatura. Esta propiedad es sorprendente ya que contradice la tendencia natural de los sistemas físicos de “ordenarse” al disminuir la temperatura¹³. Es por esto que el mencionado proceso se denomina transición inversa y la temperatura a la que ocurre se denomina temperatura de transición (T_t). Esta temperatura puede variarse modificando la composición del pentapéptido, de modo que su valor dependerá de la naturaleza del residuo X y del número de veces que se repita la secuencia pentapéptídica (n). Además esta temperatura se ve afectada por el pH, la fuerza iónica, la presión y las modificaciones covalentes como la fosforilación¹⁰.

En los primeros estudios sobre este tipo de polímeros, estos eran sintetizados utilizando procedimientos de naturaleza química, como pueden ser la ligación química nativa (NCL)¹⁴, la polimerización de apertura de anillos de α -amino-N-carboanhidridos (NCAs)¹⁵ o la síntesis en fase sólida impulsada por Merrifield en 1963¹⁶. Esto generaba diversos problemas, como pueden ser el coste de los reactivos químicos o la toxicidad de los mismos¹⁷. También la limitada longitud de los polipéptidos que podían sintetizarse debido a la baja eficiencia del acoplamiento entre péptidos a medida que la longitud aumenta; la falta de pureza obtenida debido a las notables cantidades de subproductos; o los largos y tediosos procedimientos de síntesis que requerían numerosos pasos de activación, protección y desprotección¹⁸. Además, los medios biosintéticos de ingeniería genética para producir este tipo de polímeros proporcionan una complejidad y un control sobre el peso molecular y la arquitectura y estereoquímica del polímero muy superior a cualquier tecnología de síntesis química¹⁹, todo ello sin comprometer las propiedades del ELP²⁰. Por estas razones, las técnicas de ingeniería genética que implican la síntesis de polipéptidos mediante tecnología de DNA recombinante son una alternativa muy atractiva para la obtención de biomateriales basados en ELPs.

2.3.2. Polímeros recombinantes tipo elastina (ELR)

Una forma sencilla y eficaz de sintetizar ELPs es una síntesis recombinante utilizando bacterias productoras, obteniendo rendimientos mucho mayores que con las síntesis químicas. Los polímeros obtenidos de esta manera se denominan recombinámeros tipo elastina o *elastin-like recombinamers* (ELRs), que son biomateriales que retienen muchas de las propiedades más interesantes de la elastina: son biocompatibles, biodegradables, bioactivos, termosensibles y con capacidad de autoensamblado.

La síntesis de los ELRs se lleva a cabo mediante la clonación de un gen recombinante para obtener copias del mismo, seguida por la transcripción y traducción necesarias para obtener el recombinámero²¹. La secuencia de DNA del gen plasmídico que codifica para la proteína deseada es transcrita a RNA mensajero, que será posteriormente traducido por los ribosomas en el citoplasma dando lugar al polipéptido. Este procedimiento se lleva a cabo por clonación *seamless*

o “sin costuras” (Figura 4), que permite un control absoluto de la secuencia final gracias al uso de las mencionadas enzimas de restricción de tipo II y IIS²².

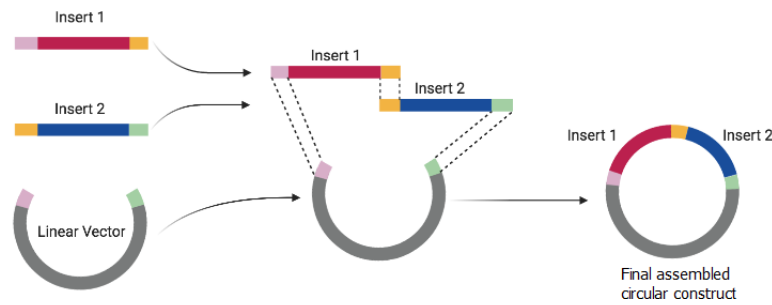


Figura 4. Representación esquemática del proceso de clonación seamless o “sin costuras”.

Este tipo de síntesis no solo mejora el control de las propiedades y la arquitectura del polímero, ventaja importante desde el punto de vista de las aplicaciones y la caracterización, sino que el aumento de la complejidad favorece la disminución global de costes en comparación con las síntesis clásicas. Asimismo se han de tener en cuenta las ventajas medioambientales que suponen estos biomateriales, ya que la síntesis recombinante no requiere el uso de petróleo, se utiliza únicamente agua como disolvente y los materiales son biodegradables²³.

2.4. POLIPLEXOS

La formación de complejos ácido nucleico-polímero mediante la combinación de ácidos nucleicos y portadores poliméricos da lugar a los denominados poliplexos. Esta combinación ocurre mediante interacciones electrostáticas²⁴. En concreto, los poliplexos de polímeros catiónicos han tenido mucha importancia en este ámbito gracias a su estabilidad electrostática con los ácidos nucleicos en el complejo. Al tener la posibilidad de formarse en varias longitudes, con diferentes grupos funcionales y en procedimientos relativamente flexibles²⁵, la especificidad que los poliplexos pueden alcanzar a la hora de utilizarse para el tratamiento o diagnóstico de enfermedades concretas es enorme.

Muchos de estos poliplexos son interesantes, además, porque su mecanismo de captación y unión celular disminuye posibles efectos adversos asociados a otros tratamientos, ya que los poliplexos son captados mediante interacciones con determinadas proteínas transmembrana sin necesidad de procesos de infección con vectores virales³. Por esta razón son un medio excelente para el transporte de genes.

Es por esto que resulta tan atractiva en el campo de la biomedicina la idea de sintetizar un polímero tipo elastina mediante tecnología recombinante que sea capaz de formar un poliplexo estable con una molécula de ácido nucleico concreta. Si el ácido nucleico que constituye la parte génica del poliplexo es portador de un gen que codifica para una determinada proteína terapéutica, se puede utilizar el poliplexo para diagnosticar, prevenir o tratar enfermedades.

2.5. APLICACIONES BIOMÉDICAS DE LOS POLIPLEXOS CON ELRs: CÁNCER

El cáncer, entendido como un grupo de más de 100 enfermedades distintas que se caracteriza por el crecimiento descontrolado de células anormales en el organismo²⁶, es un problema de salud pública cuya incidencia se ha visto incrementada en las últimas décadas. A pesar de que los avances terapéuticos y el diagnóstico precoz han reducido su mortalidad^{27,28,29}, sigue siendo una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Y se mantiene como una enfermedad cuyo pronóstico genera incertidumbre y cuyo tratamiento produce numerosos efectos secundarios en la salud de los pacientes.

Uno de los problemas más importantes a la hora de enfocar el problema del cáncer es la escasez de tratamientos adecuados. Esto se debe, en muchas ocasiones, a la falta de especificidad de los tratamientos quimioterapéuticos o radioterapéuticos convencionales, ya que no están dirigidos exclusivamente a células cancerosas. Como consecuencia, afectan negativamente a células sanas pudiendo provocar efectos secundarios muy graves o incluso la muerte³⁰. En este contexto, las terapias génicas dirigidas son una aproximación viable y segura en el tratamiento de pacientes con cáncer, ya que se basan en la introducción de genes funcionales en células somáticas corrigiendo defectos genéticos o ejerciendo un efecto terapéutico³¹.

Un enfoque interesante para este tipo de terapias es diseñar sistemas que permitan la introducción de un fragmento génico (comúnmente denominado “gen suicida”) en las células cancerosas, que induzca la expresión de una proteína capaz de provocar la auto-destrucción de la célula tumoral. Esto puede conseguirse utilizando poliplexos.

Como se ha mencionado, las nanopartículas del poliplexo están formadas por un polímero y una molécula de ácido nucleico. Cada uno de estos dos componentes tienen una función muy específica. Por un lado, el ácido nucleico, una vez liberado en el interior de las células cancerosas, puede actuar como tratamiento. Por ejemplo, se podría introducir un gen que codifique para una proteína como la ribonucleasa (RNAasa), la cual, una vez presente en el citoplasma, favorece la degradación celular al catalizar la hidrólisis del RNA³². Por su parte, el polímero recombinante desempeña la función de proteger y dirigir la nanopartícula hacia las células cancerosas exclusivamente, eliminando así el problema de la inespecificidad y los efectos secundarios adversos de los tratamientos convencionales. Este trabajo se centra en la síntesis del mencionado polímero recombinante mediante ingeniería genética, de forma que sea capaz de proporcionar la especificidad deseada en el tratamiento.

2.5.1. Fragmento scFv: direccionamiento

El método elegido para proporcionar esta especificidad en el direccionamiento es la introducción de un gen que codifique para un fragmento, llamado scFv (*single chain fragment variable*), de un anticuerpo monocatenario. Los anticuerpos (Ac) o inmunoglobulinas (Ig) son glicoproteínas que,

como parte del sistema inmune, son capaces de identificar y neutralizar objetos extraños en el organismo de forma específica gracias a los parátomos: estructuras situadas en los extremos superiores de la molécula de anticuerpo (forma de “Y”).

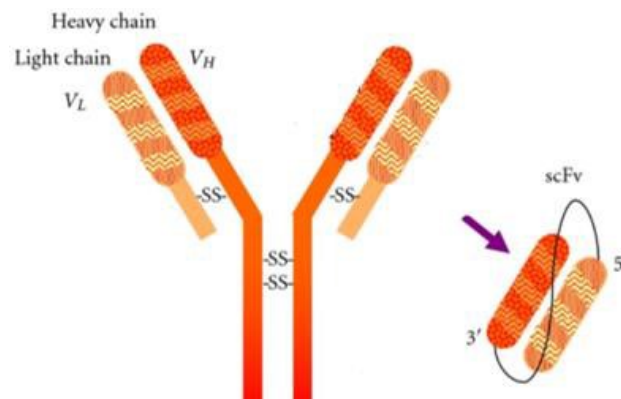


Figura 5. Estructura esquemática de un fragmento de anticuerpo scFv (derecha) y de un anticuerpo completo (izquierda).

El scFv está constituido por el dominio variable ligero (VL) y el dominio variable pesado (VH) de un anticuerpo, que son las regiones responsables de la unión al antígeno. Estas dos regiones están unidas entre sí mediante un péptido flexible de pequeño tamaño cuya estructura está estabilizada por puentes disulfuro (Figura 5).

Concretamente, existen algunos fragmentos de anticuerpo de este tipo que pueden reconocer proteínas que se encuentran sobreexpresadas en la superficie celular de las células tumorales o de su entorno próximo, véase la proteína Tenascina C en el 90% de los cánceres de mama³³ o la proteína EpCAM en cánceres de colon³⁴.

Es este potencial terapéutico lo que confiere un elevado interés a la búsqueda de métodos eficaces de combinación de los scFv con polímeros recombinantes tipo elastina, pretendiendo sintetizar anticuerpos artificiales con características bioactivas específicas³⁵.

3. OBJETIVOS

Como se ha explicado, las propiedades de los recombinámeros tipo elastina son realmente útiles a la hora de sintetizar biomateriales para aplicaciones biomédicas. Por lo tanto, en este trabajo se pretenden construir genes recombinantes para la posterior bioproducción de nuevos ELRs que se puedan utilizar en la formación de poliplexos. En concreto, se plantean dos proyectos: la síntesis de un plásmido recombinante que codifique para el biopolímero scFv(EpCAM)-VOK-H6 para que pueda ser producido en trabajos posteriores; y la producción del biopolímero P12VOKH6.

Ambos biopolímeros tienen una doble función: la función de autoensamblarse para dirigir la nanopartícula resultante hacia las células de interés gracias al fragmento scFv (EpCAM y P12) y la formación del poliplexo mediante interacciones electrostáticas del bloque ELR con el DNA terapéutico (VOK).

Para realizar ambas tareas se propone el siguiente plan de trabajo:

1. Emplear técnicas de Ingeniería Genética y Biología molecular para sintetizar un plásmido recombinante capaz de expresar el recombinámero proteico scFv(EpCAM)-VOK-H6. Este proceso se desarrolla mediante clonación génica en células procariotas *E. coli*. La clonación incluye la linealización del plásmido de partida y varias reacciones de ligación y digestión posteriores que finalizan en la introducción del inserto completo en un vector de expresión. Este plásmido podrá utilizarse en posteriores trabajos para realizar una bioproducción.
2. Producir el recombinámero P12VOKH6 a gran escala y purificarlo mediante cromatografía en fase sólida en columna de afinidad.
3. Realizar una caracterización físico-química del ELR P12VOKH6 sintetizado empleando distintas técnicas: electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), espectroscopía de infrarrojo (FT-IR), espectrometría de masas (MALDI-TOF), dispersión dinámica de la luz (DLS), cromatografía en fase sólida de exclusión por tamaños, resonancia magnética nuclear (RMN) y análisis de aminoácidos por HPLC.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES

4.1.1. Reactivos químicos

Los reactivos químicos que se han utilizado en este trabajo se han adquirido a varios suministradores y se exponen en la siguiente lista en orden alfabético:

- Acetato de magnesio.
- Ácido acético.
- Ácido clorhídrico; HCl.
- Ácido etilendiaminotetraacético; EDTA.
- Albúmina sérica bovina; BSA
- Ampicilina.
- Azul de bromofenol.
- Azul de Coomassie (Fisher Bioreagents™)
- Butanol
- Cloruro de cobre (II); CuCl₂.
- Cloruro de magnesio; MgCl₂.
- Cloruro de potasio; KCl.
- Cloruro de sodio; NaCl.
- Dimetilsulfóxido; DMSO.
- Ditioltreitol; DTT.
- *DNA Marker*: NZY DNA Ladder III
- Dodecilsulfato sódico; SDS.
- Etanol.
- Extracto de levadura.
- Fluoruro de fenilsulfonilmetano; PMSF.
- Glicerol.
- Glucosa.
- *Green Buffer Fast Digest* 10x.
- Hidróxido sódico; NaOH.
- Isopropanol
- Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido, IPTG.
- Kanamicina.
- NZY-Bluesafe®, marcador de proteínas.
- Persulfato amónico; PSA.
- Poliacrilamida (acrilamida+bisacrilamida).
- SeaKem® LE Agarosa.
- SimplySafe™
- SYBR Safe®; colorante.
- Sulfato de magnesio; MgSO₄.
- Tetrametilendiamina; TEMED.
- Tris(hidroximetil)aminometano; Tris.
- β-mercaptoetanol.

A lo largo del trabajo se explicará el papel que desempeña cada uno de estos reactivos.

4.1.2. Disoluciones tamponadas

Las disoluciones utilizadas durante este trabajo se concretan a continuación.

- **SDS-PAGE Protein Loading Buffer 5x**: 10% (m/v) SDS, 25% (v/v) β mercaptoetanol, 2% (v/v) azul de bromofenol (BPB), 50% (v/v) glicerol, 0.3 M Tris; pH 6.8.
- **Tampón fosfato salino, PBS**: NaCl 173mM, KCl 2.7mM, Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 1.8 mM; pH 7.4.
- **Running Buffer gel proteínas 5x**: Tris base 0.12M; glicina 0.96M; SDS 0.02M pH 8.3. La disolución de SDS se prepara por separado y se añade después del ajuste del pH.
- **Buffer TAE 50x**: 40 mM Tris, 19 mM ácido acético, 1 mM EDTA; pH 8.
- **DNA Loading Buffer 5x**: 50 mM Tris-HCl, 0.05 mM EDTA, 0.05% (v/v) azul de bromofenol, 30% (v/v) glicerol; pH 8. Conservar a 4°C.

- **Tango Buffer 10x:** 33 mM Tris-acetato, 10 mM acetato de magnesio, 66 mM acetato de potasio, 0.1 mg/mL albúmina sérica bovina (BSA); pH 7.9.
- **Buffer SAP 10x:** 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂; pH 9.0.
- **Buffer DNA ligasa_10x:** 300 mM Tris-HCl; 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 1mM ATP; pH 7.8.
- **Tampón de sonicación:** 20 mM Tris-base, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF; pH 8.0.
- **Buffer de lavado de bacterias:** Tris-base 20 mM, NaCl 140 mM, pH 8.
- **Buffer de lisis o de sonicatedo:** Tris-base 20 mM, EDTA 1mM, PMSF 1mM, pH 8
- **MES Buffer** (Columna Thermo Scientific HisPur™ Ni-NTA Resin): 20 mM 2-(N-morpholine)-ethanesulfonic acid, NaCl 0.1 M; pH 5.
- **Buffer de equilibrado** (Columna Thermo Scientific HisPur™ Ni-NTA Resin): guanidina-HCl 3M, imidazol 10 mM, en PBS; pH 7.
- **Buffer de lavado en gradiente 1** (Columna Thermo Scientific HisPur™ Ni-NTA Resin): guanidina-HCl 3M, imidazol 25 mM, 10 mM DTT en PBS; pH 7.4.
- **Buffer de lavado en gradiente 2** (Columna Thermo Scientific HisPur™ Ni-NTA Resin): imidazol 25 mM, en PBS; pH 7.4.
- **Buffer de elución** (Columna Thermo Scientific HisPur™ Ni-NTA Resin): imidazol 250 mM, en PBS; pH 7.4.

4.1.3. Disoluciones de tñido

4.1.3.1. *Geles de poliacrilamida*

- **Azul brillante de Coomasie:** el Azul de Coomasie se une a muchos tipos de aminoácidos. Se prepara en una disolución de 0.1% de Azul de Coomasie, 40% metanol, 10% ácido acético y 50% agua. Se elimina el exceso de tinte en una disolución de 40% metanol, 10% ácido acético y 50% agua.
- **Disolución de tñido de cobre (II); CuCl₂.** Se prepara una disolución 0.2M de CuCl₂ en agua destilada. Se destiñe con agua destilada.

4.1.3.2. *Geles de agarosa*

- **Disolución de tñido para gel de agarosa.** Se prepara una disolución del 0.005% de colorante SYBR Safe en Buffer TAE 1x.

4.1.4. Materiales de biología molecular

4.1.4.1. *Cepas bacterianas*

En este trabajo se utilizaron cepas bacterianas de *E. coli*.

- **SHuffle® T7 competent *E. coli*** (cfu/μg de pUC18 DNA ≥ 10⁷) empleada para la expresión de proteínas o polímeros recombinantes. Esta cepa está modificada por ingeniería genética para promover el plegamiento de la proteína en el citoplasma mediante la formación de puentes disulfuro.

- **BLR (DE3) competent Cells** (Novagen); eficiencia (cfu/ μg de pUC19 DNA $\geq 10^6$) empleada para la expresión de proteínas o polímeros recombinantes. Esta cepa bacteriana genera altos rendimientos de producción a partir de plásmidos que contienen secuencias repetitivas o cuyos productos pueden causar la pérdida del profago DE3.
- **NZY5 α Competent Grade** (Nzytech; eficiencia (cfu/ μg de pUC18 DNA) $\geq 10^9$) empleada para clonación o ligación de DNA.

En microbiología, cfu es un término que hace referencia al número de colonias formadas respecto a la concentración de plásmido utilizado y el volumen de bacterias sembrado en la placa.

4.1.4.2. Medios de cultivo bacteriano

Las bacterias necesitan medios de cultivo específicos para su crecimiento. Estos medios se han utilizado y preparado según los protocolos optimizados para obtener el mayor rendimiento. Se han utilizado los siguientes medios:

- **LB (Lysogeny Broth)** (Formedium™): Su composición es de 10 g/L de bacto-triptona, 10 g/L NaCl y 5 g/L de extracto de levadura. El medio líquido contiene 25 g/L de LB en agua destilada; pH 7.0. Es el medio líquido para el crecimiento bacteriano de elección en la fase de clonación.
- **LB-agar:** Se prepara en una disolución de 25 g/L del medio LB mencionado anteriormente y 15 g/L de bacto-agar; pH 7.0. Se trata del medio sólido con el cual se recubren las placas de cultivo bacteriano. El medio semisólido (50-60C^o) se vierte en las placas de cultivo bacteriano (unos 30 mL), y solidificará al enfriarse permitiendo su posterior uso para la siembra de cultivos bacterianos.
- **TB (Terrific Broth)** (Formedium™): Su composición es de 20 g/L de triptófano, 24 g/L de extracto de levadura, 4 mL/L de glicerol, KH₂PO₄ 0.017 M y K₂HPO₄ 0.072 M; pH 7.0. Es el medio líquido seleccionado si se pretende aumentar la biomasa y, por lo tanto, la producción un polímero recombinante tipo elastina.
- **S.O.C. Medium Fisher** (Bioreagents™): Se trata del medio líquido seleccionado para producir transformaciones bacterianas de manera satisfactoria. Su composición es 2% (m/v) de triptófano, 0.5% (m/v) de extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ y 20 mM Glucosa; pH 7.0.

Los medios de cultivo deben ser esterilizados en ambiente húmedo mediante un ciclo de autoclave a 121°C y 1 atm de presión durante 15 minutos. Una vez atemperado el medio, se puede añadir la cantidad adecuada de antibiótico.

4.1.5. Vectores plasmídicos

4.1.5.1. Vector de clonación

Como vector de clonación de partida se ha utilizado el plásmido pDriveAll (también nombrado como pDA), modificado por el Dr. A. Ribeiro³⁶ en el grupo de Materiales Avanzados y Nanobiotecnología BIOFORGE a partir del vector de clonaje pDrive de Qiagen.

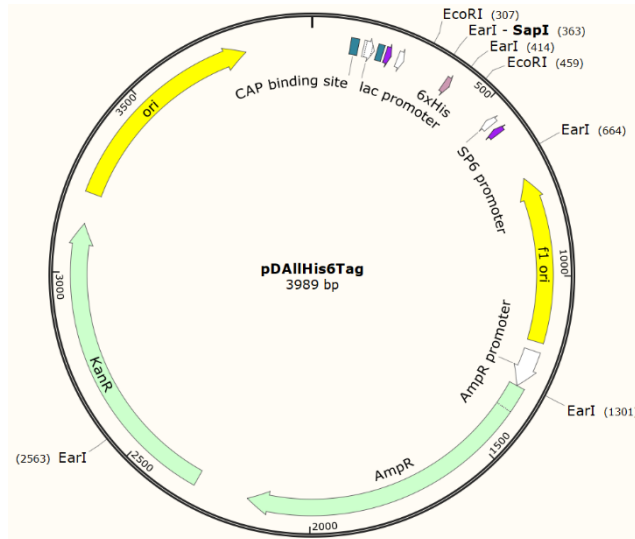


Figura 6. Representación esquemática del plásmido pDAH6. Se indican los sitios específicos de corte de las enzimas de restricción EarI, EcoRI y SapI para este plásmido.

Este plásmido ha sido modificado previamente a la realización de este trabajo, de forma que se le ha introducido una cola de histidinas para la posterior purificación del polímero por cromatografía de afinidad, ya que la histidina es el aminoácido con mayor capacidad de interacción con matrices de iones metálicos inmovilizados. Por tanto, los experimentos de clonación en este trabajo utilizan como vector de clonación de partida el pDAH6 (Figura 6). Además, contiene genes que le confieren resistencia a los antibióticos Ampicilina y Kanamicina. Este vector está constituido por 3988 pb.

4.1.5.2. Vector de expresión

Como vector de expresión se ha utilizado el plásmido pET7, compuesto por el vector de expresión p7rare o pET7 (construido a partir de un pET-25b(+)) (Figura 7) por la Dra. Alessandra Girotti⁵ en el grupo de Materiales Avanzados en Nanobiotecnología BIOFORGE) y los insertos scFv y VOK. El plásmido contiene un gen que le confiere resistencia al antibiótico Ampicilina, además de fragmentos de DNA imprescindibles para la síntesis del polímero recombinante tipo elastina que se pretende producir.

En este trabajo se parte del plásmido p7rare-scFv(P12)-VOK-H6 o p7-scFv(P12)-VOK-H6 ya sintetizado. Es decir, previamente se ha construido un plásmido que contenía el inserto scFv(P12)-VOK-H6 y este ha sido introducido en el vector de expresión pET7 o p7rare mencionado.

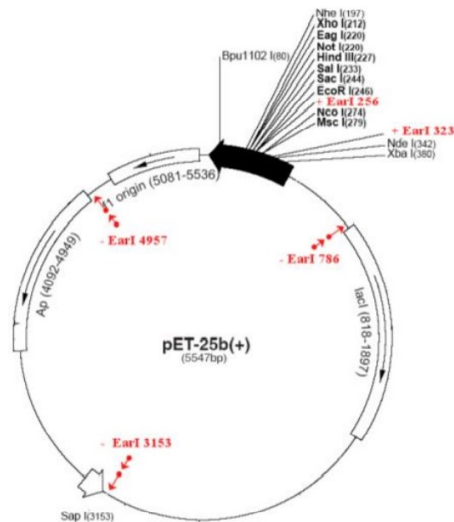


Figura 7. Representación esquemática del vector de expresión pET-25 modificado, denominado pET7. En rojo se representan las modificaciones del pET7 respecto del pET-25.

4.1.6. Plásmidos empleados para la introducción de insertos

En el presente trabajo se ha necesitado introducir insertos génicos en los vectores plasmídicos mencionados. Estos insertos contienen los genes que codifican los bloques cruciales para la obtención del polímero recombinante que se sintetizará posteriormente.

4.1.6.1. pD-VOK

El inserto génico VOK, que adopta su nombre a partir del inserto proteico que codifica, se obtiene a partir del vector de clonación pDVOK. Este fragmento génico codifica un polímero policationico cuya función es interaccionar con las cargas negativas del DNA para formar un poliplexo estable. El tamaño de este inserto génico es de 1080 pb.

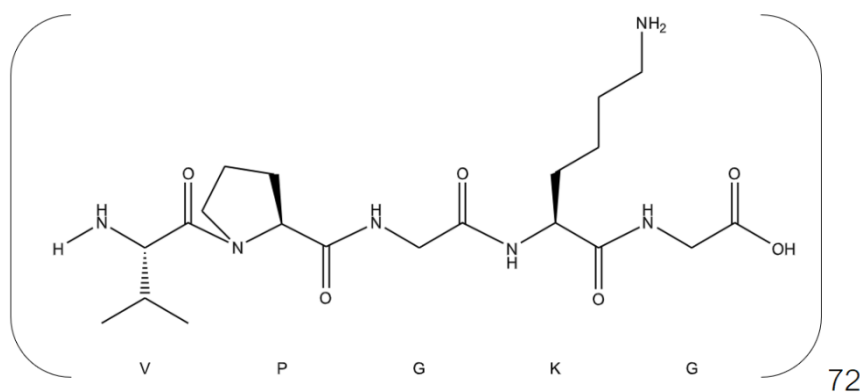


Figura 8. Representación esquemática de la molécula del inserto VOK. Se indican el número de veces que se repite la secuencia y los aminoácidos representados, donde V es valina, P es prolina, G es glicina y K es lisina (según el código de aminoácidos de una letra).

Este fragmento proteico está constituido por la repetición de la secuencia de aminoácidos básica de los ELR con la lisina como aminoácido huésped. Esta secuencia pentapeptídica se repite un total de 72 veces, formando el polipentapéptido (VPGKG)₇₂ (Figura 8), que le confiere un tamaño de 33 kDa. La gran cantidad de grupos amino cargados positivamente en condiciones fisiológicas gracias

a los 72 aminoácidos lisina a lo largo de la cadena polipeptídica es lo que aporta esa característica policatiónica al polímero.

4.1.6.2. Plásmidos con scFv

El inserto génico scFv (*single chain fragment variable*) adopta su nombre a partir del inserto proteico que codifica y posee actividad reconocedora de antígeno (anticuerpo).

Todos los fragmentos proteicos scFv poseen la característica común de tener 4 L-cisteínas (C) capaces de formar dos puentes disulfuro formando la estructura terciaria de la proteína y generando así su conformación nativa y activa.

En este trabajo se utilizan dos plásmidos que contienen fragmentos de scFv distintos.

4.1.6.2.1. Plásmido PUC57-scFv(EpCAM)

Este inserto génico se obtiene a partir del vector pUc57-scFv(EpCAM) ya construido, adquirido comercialmente, y está constituido por 762 pb. Este fragmento génico codifica para el fragmento de anticuerpo que se une de manera específica al antígeno EpCAM (*Epithelial Cell adhesion molecule*), el cual se encuentra sobreexpresado en tejidos de carcinomas de colon en humanos³⁴.

La secuencia de aminoácidos del fragmento proteico scFv(EpCAM) es la siguiente (aparecen marcadas en amarillo las cuatro cisteínas que permiten el plegamiento de la proteína):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSTKSLLSHNGITYLYWYQQKPGKAPKLLIYQMSNLSGVPSRFSSSGSG
TDFLTISLQPEDFATYYCAQNLEIPRTFGQGTKVELKRATPSHNSHQVPSAGGPTANSGETSGSEVQLVQSG
PGLVQPGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWWKQAPGKGLEWGWINTYTGESTYADSFKGRFTFSLDTSASA
AYLQINSLRAEDTAVYYCARFAIKGDYWGQGTLLTVSS

4.1.6.2.2. Plásmido PUC57-scFv(P12)

Este inserto se obtiene a partir del vector de clonación pUc57-scFv(P12) ya construido, adquirido comercialmente, y está constituido por 720 pb. Este fragmento génico codifica para el fragmento de anticuerpo que se une de manera específica al antígeno Tenascina C, una proteína que se encuentra sobreexpresada en tejidos tumorales en cánceres de mama³³.

La secuencia de aminoácidos de la proteína scFv(P12) es la siguiente (aparecen marcadas en amarillo las cuatro cisteínas que permiten el plegamiento de la proteína):

VEVOLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGQYSMSWVRQAPGKLEWVSAITGTGGSTYYADSVKG
RFTISRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKGRIFDYWGQGLVTVSRGGGGSGGGGGSSSEL
TODPAVSVALGOTVRITCOGDSLRRQPASWYQQKPGQAPVLVIYYKLRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTI
TGAQAEDADYYCNFSFKPKPVVFGGGTKLTVLG

4.1.7. Enzimas

Se utilizaron diferentes tipos de enzimas para el tratamiento y manipulación del DNA plasmídico. Para el uso de todas ellas se siguió cuidadosamente el protocolo correspondiente (*Thermo Fisher*®) y se utilizó su correspondiente tampón o *buffer*.

4.1.7.1. Enzimas de restricción

Las enzimas de restricción son proteínas endonucleasas con actividad catalítica nucleasa, es decir, catalizan la reacción de hidrólisis de enlaces fosfodiéster en secuencias de pares de bases muy específicas, originando diferentes fragmentos de restricción a partir de un fragmento de DNA. En este trabajo se emplearon enzimas de restricción de tipo II y de tipo IIS. A continuación, se muestran las enzimas de restricción de tipo II que se han utilizado (Tabla 1).

Tabla 1. Enzimas de restricción. Se muestran sus secuencias diana y su uso principal en este trabajo.

Enzima de restricción	Secuencia diana	Tampón o <i>buffer</i>	Uso en este trabajo
<i>EcoRI</i>	5' G <u>AATTC</u> 3' 3' CTTA <u>AG</u> 5'	Green Buffer Fast Digest 10x	<u>Digestiones analíticas:</u> Identificación cualitativa de fragmentos de DNA.
<i>EarI</i>	5' CTCTTCN <u>NNN</u> 3' 3' GAGAA GNNNN 5'	<u>Digestiones analíticas:</u> Green Buffer Fast Digest 10x <u>Digestiones preparativas:</u> Tango Buffer 10x	<u>Digestiones analíticas:</u> Identificación cualitativa de fragmentos de DNA. <u>Digestiones preparativas:</u> Extracción de inserto en pDA.
<i>SapI</i>	5' GCTCTTCN <u>NNN</u> 3' 3' CGAGAA GNNNN 5'	Tango Buffer 10x	<u>Digestiones preparativas:</u> Linealización de plásmidos.
<i>VspI</i>	5' <u>ATTAAT</u> 3' 3' TAA <u>TTA</u> 5'	Tango Buffer 10x	<u>Digestiones analíticas:</u> Identificación cualitativa de fragmentos de DNA. <u>Digestiones preparativas:</u> Digestión de plásmidos.
<i>XbaI</i>	5' T <u>CTAGA</u> 3' 3' AGATC <u>T</u> 5'	Green Buffer Fast Digest 10x	<u>Digestiones analíticas:</u> Identificación cualitativa de fragmentos de DNA.

4.1.7.2. Enzimas de modificación

En este apartado se hace referencia a otras enzimas (tipo IIS) que han sido utilizadas en este trabajo pero que no tienen la mencionada actividad endonucleasa, sino que cumplen otras funciones. Son las siguientes:

- **T4 DNA Ligase.** Enzima con actividad ligasa. Su función es catalizar la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 3' y 5' de una cadena de DNA linealizada.
- **FastAP** (*Thermosensitive Alkaline Phosphatase*). Enzima fosfatasa de la familia de las esterasas. Su función es catalizar la reacción de defosforilación de fragmentos de DNA, es

decir, aumentar la velocidad de reacción de hidrólisis de los grupos fosfato del DNA, evitando así su linealización sin haber incorporado el inserto en la reacción de ligación.

4.1.8. Kits para el tratamiento de DNA

Dado que en este trabajo se pretende obtener biopolímeros con características concretas que cumplan funciones específicas, cabe destacar la importancia de trabajar con fragmentos de DNA puros de secuencias y concentraciones conocidas. Para asegurar que esto se cumpla, se trabaja con kits que contienen protocolos previamente optimizados por la marca comercial con el objetivo de garantizar la eficacia del procedimiento experimental. Estos kits son:

- **NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid)** (*Macherey-Nagel*). Se utiliza para la purificación de pequeñas muestras de DNA plasmídico a partir del cultivo bacteriano previo (5-10mL). El fundamento teórico en que se basa la técnica se explica en el *apartado 4.2.7.1*.
- **PureLink Quick Gel Extraction Kit** (*Invitrogen, Life Technologies*). Se utiliza para la purificación de DNA a partir de una banda de gel de agarosa. El fundamento teórico en que se basa la técnica se explica en el *apartado 4.2.7.2*.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Electroforesis en gel

La electroforesis en gel es un método empleado para separar macromoléculas en función de su tamaño, carga eléctrica y otras propiedades como su conformación.

La muestra debe situarse en o sobre un medio soporte con objeto de evitar perturbaciones mecánicas y corrientes de convección durante la separación. Los medios de soporte (“geles”, medios semisólidos o gelatinosos) están formados por polímeros que forman una malla, matriz o red tridimensional a través de la cual deben avanzar las moléculas de la muestra gracias a la tensión eléctrica aplicada, quedando la muestra embebida en el medio de soporte electroforético. Como consecuencia, la fricción es notable y los factores de forma y tamaño adquieren una alta relevancia en la separación.

4.2.1.1. *Electroforesis de DNA en gel de agarosa*

En concreto, la electroforesis de DNA en geles de agarosa (Figura 9) permite la separación de DNA, plásmidos o fragmentos génicos en base a su tamaño.

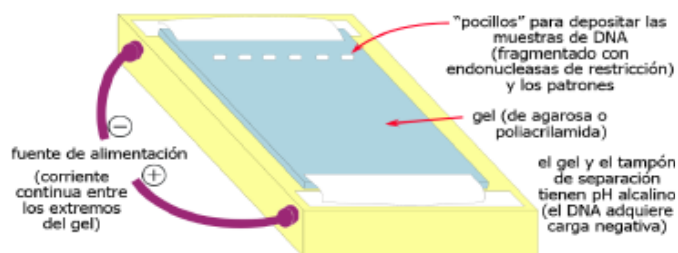


Figura 9. Representación esquemática de una electroforesis de DNA en gel de agarosa.

La agarosa, coloide natural que se extrae de las algas, es un polisacárido lineal que forma fibras helicoidales al solidificar, creando una malla tridimensional de canales con diámetros entre 50 y >200 nm. El tamaño de estos canales puede ser controlado variando la concentración y tipo de agarosa. Se emplean para separar moléculas de diferentes rangos con un peso molecular desde 20 pb hasta más de 20 kbases. En la Tabla 2 se puede observar la gama de tamaños de los fragmentos de DNA y el porcentaje de agarosa óptimo.

Tabla 2. Porcentaje óptimo de agarosa en el gel de electroforesis en función del tamaño del fragmento de DNA a analizar en pares de bases.

% (m/v) de agarosa SeaKem® en el gel (disuelta en Buffer TAE)	Rango de tamaños de los fragmentos de DNA medido en pares de bases
0.75	10000-15000
1.0	500-10000
1.25	300-5000
1.5	200-4000
2.0	100-2500
2.5	50-1000

El disolvente es un tampón Buffer TAE, un tampón de separación cuyo pH de 8 permite que los grupos fosfato de las moléculas de DNA se encuentren cargados negativamente asegurando que la carga de las moléculas sea constante e idéntica, y por tanto garantizando la separación única y exclusivamente en función del tamaño de las mismas.

El gel de agarosa se prepara según el porcentaje óptimo de polímero (Tabla 2) disolviéndolo en la cantidad adecuada de Buffer TAE. Se calienta después hasta los 50°-60° C para obtener una mezcla homogénea, y por último se vierte en un formador con el peine adecuado que generará los pocillos donde se introducirán las muestras. Cuando el gel solidifica, se dispone en una cámara de electroforesis y se integran las muestras en un tampón de carga (DNA Loading Buffer) cuyas funciones son mantener el pH en un valor de 8 y seguir del avance de la electroforesis gracias al frente del colorante Azul de Bromofenol. Entonces se cargan las muestras y un marcador de referencia (*apartado 4.2.8*).

A continuación, los geles se someten a un voltaje fijo comprendido entre 2 y 7 V/cm que distan los electrodos según la electroforesis sea preparativa (menor voltaje) o analítica (mayor voltaje). Esto depende de la finalidad con la que se realice la electroforesis: analítica, con el fin de identificar fragmentos cualitativa y cuantitativamente para comprobar el éxito de una reacción previa; o preparativa, con el fin de aislar, extraer y purificar un determinado fragmento de DNA contenido en una banda del gel (el proceso de purificación se explica en el apartado 4.2.7.2). En las electroforesis preparativas es mucho más importante la resolución, por tanto se busca que las bandas se desplacen lentamente y por ello el voltaje usado es menor que en las electroforesis analíticas. La electroforesis finaliza cuando los colorantes de referencia alcanzan una posición concreta en el gel.

Terminada la electroforesis, el gel se tiñe con la disolución de tinte para gel de agarosa (apartado 4.1.3.2), que contiene un marcador fluorescente de DNA (fluoróforo protegido bajo patente) que es capaz de intercalarse entre las bases nitrogenadas del DNA en Buffer TAE durante unos minutos. Posteriormente, el gel puede ser observado empleando un transiluminador de luz UV Gel Doc™ EZ Imager.

4.2.1.2. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE discontinuo)

En este trabajo se utilizan geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) para la separación e identificación de proteínas. El gel de poliacrilamida es el resultado de la polimerización química de una mezcla de acrilamida y bisacrilamida (Figura 10). Regulando sus concentraciones y proporciones se consiguen diferentes porosidades, que determinarán el avance de las moléculas de la muestra.

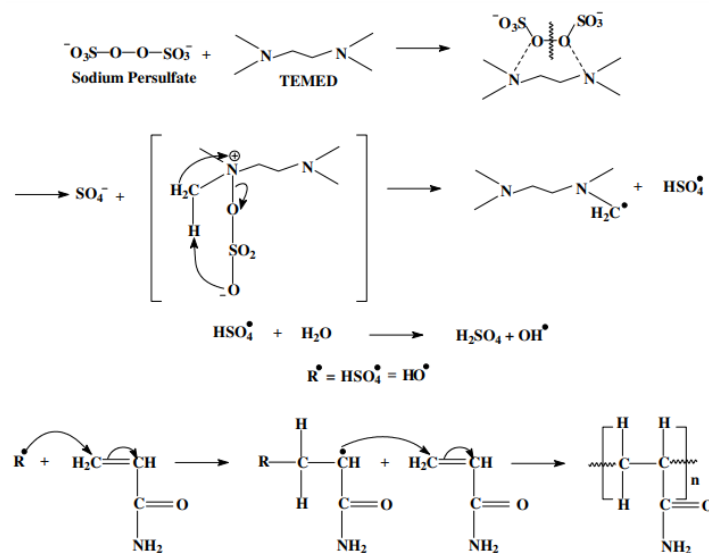


Figura 10. Mecanismo radicalario de formación de poliacrilamida.

Para que los componentes tengan una relación masa/carga constante, se añade un detergente aniónico (SDS). Cada molécula de detergente se une a dos aminoácidos, de modo que las moléculas que contengan el mismo número de aminoácidos se desplazarán a la misma velocidad. Además, el complejo SDS-proteína está cargado negativamente, por tanto, la carga de la proteína no afectará a su velocidad de avance. Otra de las funciones que tiene este detergente, unido al β-mercaptoetanol, es la de desnaturalizar las proteínas de modo que se mantengan en su forma lineal. Todo este mecanismo conjunto provoca que la velocidad de desplazamiento de las moléculas dependa únicamente de su masa.

Existe una expresión que relaciona linealmente el logaritmo de la masa molecular de la proteína con su Rf (factor de retraso), donde:

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

Siendo así, se puede comparar el logaritmo de la masa molecular con el R_f y determinar la masa molecular de las proteínas en la muestra.

Este gel de poliacrilamida requiere dos medios diferentes: un gel compactador, con menor concentración de acrilamida y menor pH, cuya función es permitir la formación del frente de proteínas en una banda compacta; y un gel de resolución con mayor concentración de acrilamida y mayor pH, cuya función es permitir el avance de las proteínas y su separación por tamaño. El gel compactador se prepara mezclando agua ultrapura, Tris 0.5M (pH=6.8), acrilamida al 40% (m/v), SDS al 10% (m/v), persulfato de sodio al 10% (m/v) y TEMED o TMEDA. El persulfato de sodio y el TEMED reaccionan para dar lugar a una especie radicalaria. Este iniciador reacciona a su vez con la acrilamida formando la mencionada malla tridimensional. Esto da lugar a una mayor rigidez en el enrejado polimérico del gel. El gel de resolución se prepara con los mismos reactivos que el gel concentrador variando la concentración y el pH del Tris (1.5M; pH=8.8). Las cantidades que se añaden a cada uno de ellos dependen del porcentaje de acrilamida del gel y del intervalo de masas moleculares en el que se encuentren las masas de las proteínas que se pretendan separar. La electroforesis se desarrolla a amperaje constante (25mA) durante aproximadamente una hora o cuando los colorantes de referencia, que poseen tanto el marcador como las muestras, alcancen el extremo del gel.

Además de las muestras a analizar, debe añadirse en uno de los pocillos del gel un marcador de referencia para la identificación del peso molecular de los fragmentos proteicos. En este trabajo se utiliza el marcador NZY-Bluesafe®, una disolución que contiene fragmentos proteicos de tamaños y en cantidades perfectamente conocidos (Figura 11). De esta manera se utiliza como patrón comparativo en las electroforesis de DNA, pudiendo realizar una semicuantificación del tamaño de los fragmentos de DNA de la muestra en un intervalo entre 10 y 180 kDa.

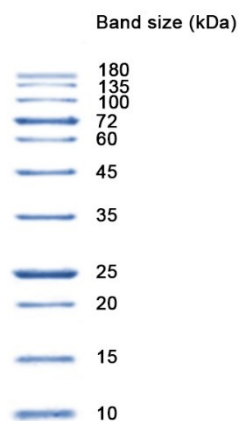


Figura 11. Bandas del marcador NZY-Bluesafe® en gel de poliacrilamida.

El último paso es el teñido del gel con el tinte adecuado. El Azul de Coomasie es un tinte que se une eficazmente a muchos tipos de proteínas. Su uso es limitado en proteínas con características

hidrofóbicas, en cuyo caso es mejor opción utilizar un tinte con disolución de cloruro de cobre. En el caso de usar Azul de Coomassie, se destiñe introduciéndolo en una disolución de destiñido para este tinte y calentándolo 30 segundos. En el caso de utilizar cloruro de cobre como tinte, se destiñe simplemente introduciéndolo en agua destilada. Una vez destiñido, las bandas pueden observarse empleando un transiluminador de luz blanca Gel Doc™ EZ Imager.

A la hora de asignar el tamaño de los fragmentos en base al patrón de bandas del marcador, se ha de tener en cuenta el retraso electroforético que provoca que las bandas aparezcan a un tamaño de banda algo mayor del real. Esto se debe a la lentitud con la que avanza el ELR en el gel a causa de su hidrofobicidad.

4.2.2. Digestión de DNA mediante enzimas de restricción

Se conoce como digestión al proceso por el cual una secuencia de DNA, llamada secuencia diana, es reconocida por enzimas de restricción con actividad endonucleasa que son capaces de cortar dicha secuencia de forma específica. Son secuencias cortas, a menudo palindrómicas, de entre 4 y 6 nucleótidos. En el *apartado 4.1.4.1* de este trabajo se han mencionado las enzimas de restricción que se han utilizado con sus secuencias diana correspondientes.

Las digestiones pueden realizarse con dos objetivos: identificar de forma cualitativa los fragmentos de DNA obtenidos para comprobar que una reacción previa ha ocurrido correctamente, en cuyo caso se llama digestión analítica; u obtener un fragmento de DNA o plásmido para purificarlo y darle un uso posterior, en cuyo caso se llama digestión preparativa. Las cantidades, el tipo de enzima y los tiempos necesarios a la hora de llevar a cabo un tipo de digestión u otro son algo diferentes, y es importante respetar las indicaciones de los protocolos que proporciona la casa comercial en cuanto a concentración, temperatura, pH, tampón y tiempo de reacción, para obtener la máxima eficacia.

En el caso de las digestiones analíticas, se han utilizado las enzimas de restricción *EcoRI*, *EarI*, *Vspl* y *XbaI*. Se mezclan 200-1000 ng de plásmido con tampón *Green Buffer Fast Digest*. La enzima se añade en la concentración especificada en el protocolo. Esta digestión debe transcurrir durante aproximadamente 60 minutos en un incubador estático a 37°C.

En el caso de las digestiones preparativas, se han utilizado las enzimas de restricción *SapI*, *Vspl* y *EarI*. Se mezclan 4000 ng de plásmido con tampón *Tango Buffer*. La enzima se añade en la concentración especificada en el protocolo. Esta digestión debe transcurrir durante aproximadamente 16 horas en un incubador estático a 37°C.

4.2.3. Defosforilación de DNA

Cuando se pretende realizar una clonación con el objetivo de introducir un inserto génico en la secuencia de un plásmido, este se debe encontrar en forma lineal, para lo cual debe haber sido

linealizado. Para que este plásmido lineal no vuelva a ciclarse espontáneamente si sus extremos son complementarios, se le somete a un proceso de defosforilación mediante el cual se produce la hidrólisis del grupo fosfato del extremo 5' de la secuencia de DNA. Este proceso se lleva a cabo utilizando la enzima FastAP.

Para llevar a cabo la reacción se añade a la disolución plasmídica la cantidad de enzima indicada por el protocolo según su actividad. Esta reacción debe transcurrir durante 10 minutos en un incubador estático a 37°C. Después se debe desactivar la enzima para frenar la reacción, ya que podrían producirse defosforilaciones indeseadas en otros puntos de la cadena. Para ello se introduce durante 5 minutos en un baño a 75°C.

4.2.4. Reacción de ligación de DNA en el proceso de clonación

Para llevar a cabo la reacción de ligación entre los plásmidos y los insertos génicos utilizados, es necesario poseer previamente un plásmido linealizado y defosforilado para que actúe como vector de clonación. El objetivo de la reacción es introducir en dicho plásmido un inserto que se encuentra ya purificado y que codifica para el biopolímero de interés. Esta reacción es catalizada por la enzima T4 Ligasa.

El proceso de reacción se lleva a cabo mezclando 70 ng del plásmido linealizado con la cantidad del inserto necesaria atendiendo a su concentración (puede ser en relación molar 1:1, 1:2, etc). Además, se añaden la enzima T4 Ligasa y el tampón *Ligase T4 Buffer*, en las proporciones indicadas por la casa comercial.

4.2.5. Transformación en cepas bacterianas

La transformación es el proceso por el cual las células captan DNA libre presente en el medio (Figura 12). El plásmido obtenido tras la reacción de ligación debe introducirse en la célula anfitriona para que, posteriormente, los ribosomas que se encuentran en el citoplasma lleven a cabo los procesos de replicación y traducción, y sinteticen el biopolímero que se pretende obtener. Estos procesos de replicación y traducción se llevan a cabo de forma independiente al genoma bacteriano gracias a que el plásmido posee un origen de replicación y promotores independientes que permiten su replicación y expresión individualizada.

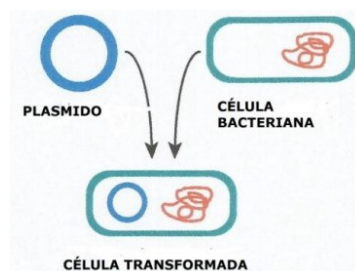


Figura 12. Representación esquemática del proceso de transformación bacteriana.

Para que la transformación tenga lugar, la bacteria debe encontrarse en el llamado estado de competencia, que ocurre en determinadas condiciones fisiológicas. En este estado, la bacteria

presenta alteraciones en su pared y membrana celulares, que permiten la entrada de ácidos nucleicos en la célula. En este trabajo se han utilizado tres cepas diferentes (*apartado 4.1.4.1*) de la bacteria *E. coli* para llevar a cabo este proceso. Cada una de estas cepas tiene un protocolo de transformación específico respecto a volúmenes y tiempos de incubación. Se va a describir primero el procedimiento general, para pasar después a explicar las especificaciones para cada cepa.

Las bacterias competentes, conservadas previamente a -80°C , el DNA plasmídico y un tubo de 14 mL deben atemperarse unos minutos a 4°C antes de la transformación. La mezcla de las bacterias y el DNA plasmídico debe incubarse a 4°C para aplicar después un choque térmico a 42°C con objeto de favorecer la permeabilización de la pared y membrana bacterianas. Tras el choque térmico se incuban 2 minutos más en hielo, se añade el medio S.O.C y se incuba 1 hora a 37°C con agitación orbital constante a 250 rpm. Transcurrido ese tiempo de incubación, se siembra un volumen adecuado de la mezcla en placas de LB-Agar previamente preparadas con el antibiótico correspondiente, ya que las bacterias adquieren resistencia a antibióticos gracias a la transformación realizada con el plásmido que confiere dicha resistencia.

Las placas permanecen almacenadas boca abajo en la incubadora estática durante unas 16 horas a una temperatura de 37°C envueltas en papel de aluminio para minimizar la evaporación. Durante este tiempo crecen colonias aisladas o clones.

Para comprobar que la transformación ha ocurrido de forma satisfactoria, se selecciona un número de colonias aisladas, se realiza una segunda siembra en medio líquido (*apartado 4.2.6.*), se extrae el DNA plasmídico y se realiza una digestión diagnóstica o *screening* y su análisis electroforético.

4.2.5.1. Transformación con NZY5 α Competent Grade Cells

En la transformación con esta cepa se utilizan 20 μL de bacterias competentes y 5 μL de disolución plasmídica. La mezcla se incuba 30 minutos en hielo previamente al choque térmico a 42°C de 40 segundos exactos. Tras 2 minutos más de incubación en hielo, se añaden 450 μL de medio S.O.C y se incuban a 37°C en la incubadora dinámica. Después, 60 y 120 μL de la disolución se siembran en dos placas, con los antibióticos Kanamicina y Ampicilina incorporados.

Esta cepa bacteriana es una cepa de clonación, es decir, el objetivo es obtener una elevada tasa de replicación del plásmido para obtener la mayor cantidad posible del mismo.

4.2.5.2. Transformación con SHuffle[®] T7 competent E.coli: cepa de expresión

En la transformación con esta cepa se utilizan 20 μL de bacterias competentes y 1-5 μL de disolución plasmídica. La mezcla se incuba 2 minutos en hielo previamente al choque térmico a 42°C de 30 segundos exactos. Tras la incubación en hielo, se añaden 250 μL de medio S.O.C y se incuban a 37°C . Después, 60 y 120 μL de la disolución se siembran en dos placas, con el antibiótico Ampicilina incorporado, 20 y 40 μL de la disolución.

Esta cepa bacteriana requiere el uso del inductor de la expresión IPTG. Cuando lleva a cabo la incubación para el crecimiento en medio líquido, debe medirse la densidad óptica y añadirse IPTG hasta 0.4mM cuando esta alcance un valor entre 0.4 y 0.8. Después se deja continuar la incubación con normalidad.

4.2.5.3. Transformación con BLR(DE3) competent cells: cepa de expresión

En la transformación con esta cepa se utilizan 20 µL de bacterias competentes y 1 µL de disolución plasmídica. La mezcla se incuba 5 minutos en hielo previamente al choque térmico a 42°C de 30 segundos exactos. Se atemperan en hielo, se añaden 80 µL de medio S.O.C y se incuban a 37°C. Después se siembran en dos placas, con el antibiótico Ampicilina incorporado, 20 y 40 µL de la disolución.

En ambas cepas de expresión (*apartados 4.2.5.2 y 4.2.5.3*), el objetivo es la síntesis o bioproducción de la proteína que codifica el plásmido introducido mediante el proceso de traducción en los ribosomas bacterianos. En este caso no es tan importante la cantidad de plásmido obtenido sino la capacidad de la bacteria para dar una tasa de expresión considerable del biopolímero de interés. El proceso de bioproducción de un polímero se explica en el *apartado 4.2.12* de este trabajo.

4.2.6. Crecimiento de bacterias en medio líquido

Tras la transformación en cepas bacterianas y la siembra de las mismas en placas de LB-Agar, es necesario realizar una resiembra en medio líquido para comprobar que la transformación ha ocurrido correctamente o para seleccionar las colonias que expresen la mayor cantidad de proteína.

Se transfiere un número significativo de colonias a tubos con el medio y el antibiótico necesarios según las características del plásmido introducido. Se incuban las bacterias a 37°C unas 16h en agitación orbital. Una vez terminado este proceso, se procede al análisis que se visualiza por electroforesis.

4.2.7. Purificación de DNA plasmídico

Cuando se trabaja con plásmidos, ya sea para que actúen como vectores o para extraer de ellos un inserto génico, es necesario tener la seguridad de que este DNA se encuentra puro en la disolución. El método de purificación se elige según el tratamiento previo que haya tenido la muestra de DNA.

4.2.7.1. *Purificación de DNA plasmídico a partir de un cultivo bacteriano en E.coli: Purificación con Protocolo NucleoSpin® Plasmid/Plasmid NoLid*

Este método de purificación se utiliza en el caso de que se pretenda extraer y purificar DNA plasmídico a partir de un cultivo bacteriano. Este DNA se encuentra en el citoplasma celular y el objetivo es eliminar los restos celulares para obtener una disolución que contenga únicamente el plásmido de interés.

Para llevar a cabo este proceso se utiliza el kit mencionado en el *apartado 4.1.8* de este trabajo, siguiendo el esquema que aparece en la Figura 13.

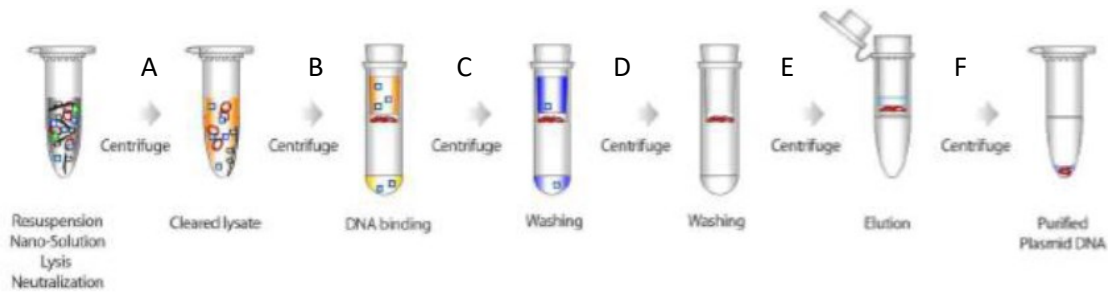


Figura 13. Representación esquemática del proceso de purificación de DNA plasmídico a partir de un cultivo bacteriano en *E. coli*. Las etapas son las siguientes. A: lisis alcalina y neutralización. B: clarificación del lisado. C: extracción en fase sólida en columna. D: lavado para la eliminación de interferentes polares. E: elución del DNA plasmídico purificado.

Existen dos protocolos basados en la lisis alcalina que se utilizan para este tipo de purificaciones y que utilizan el mismo material, pero variando las cantidades de reactivos, dependiendo si el vector de clonación es *high copy* o *low copy*. En el caso de este trabajo se ha trabajado con: el vector de clonación de tipo *high copy* pDA (la tasa de replicación del vector es elevada); y el vector de expresión pET7, *low copy* (la tasa de replicación es baja, pero la tasa de expresión es elevada).

Para llevar a cabo este protocolo se realiza un cultivo bacteriano previo en medio líquido en un volumen de 5 mL de medio en el caso de vectores *high copy*, y 10 mL de medio en el caso de vectores *low copy*. El procedimiento a seguir viene indicado en el protocolo proporcionado por la casa comercial. A continuación se indica simplemente la función de cada reactivo de forma cronológica. El primer paso del proceso permite un lavado y permeabilización de células y la degradación del RNA en disolución (Buffer A1). A continuación se lleva a cabo la lisis alcalina (Buffer A2), que rompe la pared celular y permite la salida del DNA plasmídico al medio extracelular y su posterior aislamiento. Esta lisis concluye al añadir el reactivo neutralizante (Buffer A3). Los pasos siguientes se realizan con el fin de purificar exhaustivamente el plásmido usando minicolumnas de extracción en fase sólida (SPE) (Etapa C, Figura 13). El siguiente paso es realizar un lavado con Buffer AW, que tiene mucha afinidad por los mencionados interferentes, y poca por el DNA, con lo cual los interferentes que hayan sido absorbidos por la columna eluirán en este tampón (Etapa D, Figura 13). El siguiente paso es la adición del Buffer de lavado A4 que contiene etanol, cuya función es eliminar posibles interferentes polares que hubieran podido ser absorbidos en la columna. En este punto de la purificación, en el sorbente de la columna solo está retenido el DNA plasmídico. Para realizar su elución se utiliza el Buffer AE (5M Tris-HCl, pH 8.5) (Etapa F, Figura 13), que tiene más afinidad por el DNA que la sílica de la columna, por tanto, es capaz de eluirlo.

La concentración del DNA plasmídico purificado final se mide como se ha descrito en el *apartado 4.2.9*. El plásmido purificado debe almacenarse a 4°C para su uso inmediato o a -20°C para almacenamientos más largos.

4.2.7.2. Purificación de DNA plasmídico a partir de un gel de agarosa

Cuando se pretende purificar DNA plasmídico u otros fragmentos génicos tras una electroforesis preparativa (*apartado 4.2.1.1*), el gel se tiñe normalmente y se lleva a un transiluminador de luz ultravioleta. La banda con fragmento de DNA de interés se aísla cortándola con un bisturí y se procede a su purificación siguiendo el protocolo del kit PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, Life Technologies). A continuación se explica el procedimiento de forma general.

La banda de gel cortada debe redisolverse para su purificación (*Solubilization Buffer L3*). En este punto del proceso, se tiene el fragmento de DNA libre en una disolución que contiene, además, los componentes del gel de agarosa. El objetivo es obtener una disolución del DNA puro. En este trabajo, esta purificación se realiza por extracción en fase sólida utilizando una centrifuga. Para ello se utilizan minicolumnas de extracción en fase sólida (SPE), ya que la sílica que contiene la fase sólida tiene elevada afinidad por el DNA y poca afinidad por el resto de biomoléculas. A continuación se realiza un lavado cuya función es eliminar posibles interferentes polares que hubieran podido ser absorbidos en la columna (Buffer W1). Por último, se eluye el DNA (Buffer de elución E5).

El DNA plasmídico final obtenido es un DNA purificado listo para su uso posterior, y por tanto se mide su concentración como se describe en el *apartado 4.2.9*. El plásmido purificado debe almacenarse a 0°C para su uso inmediato o a -20°C para almacenamientos más largos.

4.2.8. Identificación y análisis de los fragmentos de DNA

El marcador NZYLadderIII (NZYTech) es una disolución que contiene 14 fragmentos de DNA, de tamaños y en cantidades perfectamente conocidos (Figura 14).

De esta manera se utiliza como patrón comparativo en las electroforesis de DNA, pudiendo realizar un gráfico que compare el tamaño y recorrido de los fragmentos de DNA del marcador (línea de calibrado). Es posible entonces realizar una semicuantificación del tamaño de los fragmentos de DNA de la muestra en un intervalo entre 200 y 10 000 pb.

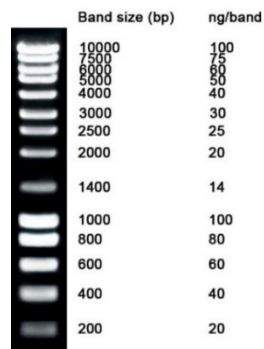


Figura 14. Bandas del marcador NZYLadder III en gel de agarosa.

4.2.9. Determinación de la concentración y la pureza de los fragmentos de DNA

Tras una purificación de DNA, es necesario conocer la concentración de dicho DNA en disolución. Para ello se realiza un análisis de absorbancia en un espectrofotómetro de microgota NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), que permite determinar cuantitativamente la pureza de muestras génicas con un volumen de 1 μ L. La absorbancia y la concentración pueden relacionarse mediante la Ley de Lambert-Beer: $A = \epsilon cl$, donde A es la absorbancia a la longitud de onda seleccionada; ϵ es la absorptividad molar a esa longitud de onda en mol/L; c es la concentración de la biomolécula que absorbe la radiación en mol/L; y l es el camino óptico en centímetros que recorre la radiación al pasar a través de la muestra.

El espectrofotómetro es de UV-Visible de espectro completo y la radiación es emitida por dos lámparas: una de Deuterio para la zona del ultravioleta, y una de Wolframio para la zona del visible. La radiación debe atravesar un monocromador con el fin de hacer incidir sobre la muestra un haz de radiación de una sola longitud de onda. Este monocromador consta de una rendija de entrada, un sistema dispersante (red de difracción) y una rendija de salida. El espectrofotómetro es capaz de evaluar la relación de absorbancias a dos longitudes de onda diferentes. Por tanto, se pueden obtener dos índices de pureza: relación A260/A280 (absorbancia a 260 nm en relación a la corregida a 280 nm); y relación A260/A230 (absorbancia a 260 nm en relación a la corregida a 230 nm). Esto permite evaluar la pureza del DNA según la Tabla 3.

Tabla 3. Grados de pureza según los valores de absorbancia en muestras de DNA medidas en NanoDrop 2000.

Relación	Valor (uds. absorbancia)	Pureza
A260/280	>2	Contaminación con RNA
	1.8-2.0	DNA de pureza óptima
	1.6-1.8	DNA de pureza aceptable
	<1.6	Presencia de aromáticos
A260/230	1.5-2.2	DNA de pureza óptima
	<1.5	Presencia de sales, carbohidratos y fenoles

Los índices de pureza son sensibles a la presencia de contaminantes en la muestra, como los disolventes y reactivos residuales que se utilizan normalmente en la purificación³⁷.

Es necesario utilizar un blanco para disminuir el ruido de fondo de la forma más eficazmente posible. De esta manera disminuye el límite de cuantificación (LOQ), pudiendo así detectar concentraciones más bajas sin disminuir la fiabilidad de los resultados. Como blanco se utiliza el *buffer* de elución con el que se haya realizado la purificación del DNA contenido en la muestra.

4.2.10. Secuenciación del DNA

El objetivo de la secuenciación es conocer el orden de los monómeros que componen un polímero lineal como es, en este caso, el DNA. Del orden de nucleótidos del DNA, así como de sus bases nitrogenadas (adenina, A; guanina, G; citosina C; timina, T) se puede inferir su evolución y función, además de servir como comprobación el éxito de procesos en ingeniería genética.

La estrategia general implica: la degradación específica y el fraccionamiento de los polinucleótidos de interés a fragmentos suficientemente pequeños para ser secuenciados; la secuenciación propiamente dicha de estos fragmentos; y el ordenamiento de los mismos. Esto se puede llevar a cabo por distintas técnicas. En este caso se utiliza el método Sanger, el cual se basa en generar, por replicación *in vitro* de un DNA, segmentos copia con el mismo origen, pero distinta longitud, que se separan por electroforesis capilar. Se consigue que tengan el mismo origen utilizando *primers* o cebadores específicos, que reconocen una secuencia concreta hibridándose a la hebra de DNA. La DNA polimerasa elonga la cadena en sentido 5'-3' a partir de dichos *primers*. Se consigue que tengan distinta longitud utilizando didesoxiNTPs, bases de DNA modificadas con fluorescencia, que actúan como terminadores, ya que su incorporación en lugar de una base convencional detiene el crecimiento del fragmento copia porque no puede reaccionar con la polimerasa.

Se prepara una mezcla que contiene: bases de DNA trifosfato (A, C, G y T), DNA polimerasa, DNA *primer* y bases de DNA modificadas con fluorescencia (didesoxiNTPs). Se introducen en un termociclador que llevará a cabo la amplificación, y el proceso que ocurre en su interior es una consecución de calentamientos y enfriamientos que permiten la síntesis de los diferentes fragmentos de DNA. Los fragmentos de DNA sintetizados llegan al final del tubo capilar separados por tamaños y un láser permite medir la fluorescencia de la base modificada terminadora de cada fragmento. Cada base emite fluorescencia a un color diferente: A verde, C azul, G amarillo, T rojo (según el código de bases nitrogenadas). Por tanto, se obtiene información de cada nucleótido uno a uno hasta completar la secuencia.

Esta secuenciación se lleva a cabo en Cenit Support Systems S.L., en el Parque Científico de la Universidad de Salamanca.

4.2.11. Preparación de muestras para electroforesis SDS-PAGE

Tras un crecimiento bacteriano en una cepa bacteriana de expresión, es necesario el aislamiento y ruptura de las células para obtener la proteína expresada y llevar a cabo un análisis de la misma por electroforesis en gel de poliacrilamida o SDS-PAGE.

Para ello se toma 1 mL del medio con las bacterias y se somete a dos ciclos de lavado en los cuales el cultivo se precipita con una centrifuga a 11 000 xg durante 45 segundos, se descarta el sobrenadante, se añade 1 mL de agua ultrapura y se resuspende el precipitado por completo. Realizado el lavado, se añaden 200 µL de agua ultra pura y se toman en un nuevo tubo 20 µL de la muestra anterior añadiendo 5 µL de *Protein Loading Buffer* 5x (1:4 v/v). Se calientan las muestras a 100°C durante 5 minutos. El β-mercaptoetanol presente en el *buffer*, favorecido por la alta temperatura, reducirá los puentes disulfuro en caso de haberlos. Por su parte, el SDS desnaturará las proteínas desplegándolas.

4.2.12. Bioproducción de polímeros recombinantes

La producción de un polímero recombinante tipo elastina parte de un vector de expresión ingenierizado de forma recombinante que incluye el DNA que codifica para dicho polímero (*apartados 4.2.4.; 4.2.5.1; y 4.2.5.2*). Lo que se pretende es favorecer la expresión de los genes que contiene ese plásmido para obtener el polímero recombinante y para la posterior purificación del mismo. En este trabajo se han utilizado dos cepas diferentes de *E. coli* para llevar a cabo esta producción: SHuffle® T7 competent *E. coli* y BLR (DE3) *E. coli*.

Tras la transformación en la correspondiente cepa bacteriana, y obtenidas las diferentes colonias en placas de LB-Agar, se debe determinar la colonia más productora, esto es, qué colonia posee mayor cantidad de proteína expresada. Para ello se realiza una segunda siembra en medio líquido (*apartado 4.2.6*) y una electroforesis en gel de poliacrilamida (*apartado 4.2.1.2*). A partir de dicha colonia más productora se puede realizar un segundo *screening*, esto es, volver a realizar una siembra en placas de LB-Agar y repetir el proceso para acabar seleccionando la colonia más productora del subcultivo a partir de la colonia más productora del cultivo inicial. La bioproducción se llevará a cabo a partir de la colonia seleccionada.




El proceso comienza con la preparación de un pre-inóculo en 5 mL de medio LB con antibiótico Ampicilina 100 mg/mL hasta una concentración del 0.1% y 250 µL de glucosa al 20% (m/v) en un tubo estéril de 50 mL. Este pre-inóculo se incuba a 37°C en agitación orbital a 250 rpm durante 16 horas. La glucosa es necesaria para inhibir la expresión génica durante el crecimiento de la biomasa, ya que actúa como represor de la traducción en *E. coli*. El siguiente paso es preparar el inóculo transfiriendo 100 µL del pre-inóculo a un matraz Erlenmeyer estéril de 250 mL con 30 mL de medio LB, Ampicilina 100 mg/mL hasta una concentración del 0.1% (v/v) y 1.5 mL de glucosa al 20% (m/v). Este inóculo se incuba a 37 °C en agitación orbital a 250 rpm durante 6 horas. Se deben tomar dos muestras de 1 mL de este inóculo antes de continuar con el siguiente paso, que permitirá realizar un posterior seguimiento de la bioproducción. El hecho de hacer un pre-inóculo y un posterior inóculo con medio de cultivo nuevo favorece el crecimiento de la biomasa de las bacterias. Posteriormente se toman dos Erlenmeyer o Flask estériles de 2 litros por cada litro de producción (en total se producirán 7.5 L, por tanto, se requieren 15 Erlenmeyer) y se les añaden 500 mL de medio de cultivo y Ampicilina hasta una concentración del 0.1% (v/v). El medio de cultivo utilizado en este trabajo consta de 2/3 (v/v) de medio TB y 1/3 (v/v) de medio LB, ya que se ha observado en experimentos anteriores que esta mezcla es adecuada para este tipo de producción. Es importante que los Erlenmeyer contengan un máximo de ¼ de su volumen para permitir una adecuada agitación y, por ende, oxigenación del cultivo. Una vez preparados los Erlenmeyer, se añade 1 mL del inóculo a cada uno y se incuban a 37°C en agitación orbital a 250 rpm durante 16 horas. Se preparan además dos muestras control a pequeña escala en tubos de 50 mL: un control de esterilidad preparado del mismo modo exceptuando la presencia de bacterias; y un control positivo

que contiene los mismos componentes que los Erlenmeyer de producción. Estos controles permiten comprobar que no existe contaminación en el medio y que la producción se está produciendo correctamente, respectivamente.

Transcurridas las 16 horas se toman dos muestras de 1 mL de los Erlenmeyer de la producción y otras dos muestras de 1 mL de la muestra control positivo. Estas muestras se diluyen 1:10 (v/v) para mantener los valores de absorbancia dentro del rango lineal dinámico, y se mide su absorbancia (muestra t_0) en un espectrofotómetro a 600 nm. El tomar dos muestras en vez de una se debe a la necesidad de utilizar uno de los tubos como blanco tras precipitar las bacterias aplicándole una centrifuga de 45 segundos 13000 xg. Esta absorbancia se anota y se estima la concentración teniendo en cuenta la dilución. Transcurridos 30 minutos de la primera medida, se toman dos muestras más de la producción y se mide su absorbancia (muestra t_{30}) siguiendo el mismo procedimiento. Si el valor de la absorbancia se mantiene prácticamente constante significa que el crecimiento celular se encuentra en fase estacionaria. Por lo tanto, se puede comenzar el lavado de células. Si la absorbancia hubiera aumentado significativamente, se tendrían que realizar medidas cada 30 minutos hasta conseguir esta estabilización de la absorbancia.

En la tabla siguiente se muestra un esquema de lo recién explicado (Tabla 4).

Tabla 4. Esquema de los distintos cultivos en el proceso de bioproducción de polímeros tipo elastina.

Pre-inóculo		x1	<ul style="list-style-type: none"> · Colonia más productora. · 5 mL medio LB · 30 μL Ampicilina 100 mg/mL · 1.5 mL Glucosa 20% (v/v)
Inóculo		x1	<ul style="list-style-type: none"> · 100 μL cultivo bacteriano · 30 mL de medio LB · 30 μL de Ampicilina 100 mg/mL
Producción		x15	Por matraz: <ul style="list-style-type: none"> · 1 mL de inóculo · 500 mL de medio LB+TB · 5 mL de Ampicilina 100 mg/mL

Las muestras del inóculo y de la producción (control, muestra t_0 y muestra t_{30}) se analizan por electroforesis SDS-PAGE para asegurar la producción ha tenido el rendimiento esperado. Para ello se lleva a cabo el proceso de preparación de muestra explicado en el apartado 4.2.11. con la siguiente salvedad en el último paso: en vez de 200 μ L, se añade la cantidad de agua ultrapura correspondiente según la absorbancia, es decir, la biomasa de cada muestra (Tabla 5).

Tabla 5. Volumen necesario para la última resuspensión en la preparación de muestras según absorbancia.

Absorbancia a 600 nm	Volumen de agua ultrapura para resuspensión (µL)
0.1-0.5	20
0.5-2	50
2-5	100
>5	200

4.2.13. Purificación de polímeros recombinantes

Es preciso llevar a cabo un lavado de las células para su aislamiento del medio de cultivo y la ruptura de las mismas para la extracción del biopolímero producido. Para ello, se vierte la producción en recipientes de centrifuga de 500 mL (no superando los 2/3 del volumen del recipiente), se someten a centrifugación a 4500 xg a 4°C durante 15 minutos y se descarta el sobrenadante. Después se añade Buffer de lavado de bacterias hasta $\frac{1}{2}$ del volumen del recipiente y se resuspende el precipitado para someterlo acto seguido a una centrifugación de 4500 xg a 4°C durante 15 minutos. Este lavado se repite descartando el sobrenadante y añadiendo Buffer de lavado hasta que el sobrenadante quede incoloro y transparente. Llegado ese punto, las bacterias se resuspenden en Buffer de sonicado, que contiene el inhibidor de proteasas PMSF. La función de este inhibidor durante la lisis celular evitará la proteólisis del biopolímero por parte de las proteasas bacterianas liberadas.

La ruptura de células se lleva a cabo mediante ciclos de sonicación a altas presiones (1500-1800 bar) y bajas temperaturas (4°C). Este proceso de sonicado se lleva a cabo en el grupo *ProcerealTech* y el equipo utilizado es un sonicador Hielscher UP400St. Los ciclos de sonicación favorecen la ruptura de la pared y membrana bacterianas liberando el polímero al medio líquido. Tras la sonicación, el lisado bruto obtenido se vierte en tubos de 50 mL y se realiza una centrifuga fría a 14000 xg y 4°C durante 90 minutos. Esto permite separar los restos celulares (en el precipitado, *Prec.Sonic*) del polímero (en el sobrenadante, *Sb.Sonic*). Este sobrenadante se somete a una etapa de purificación para eliminar otros posibles interferentes como proteínas no recombinantes presentes.

Con el objetivo de realizar un seguimiento para comprobar que el aislamiento se ha realizado con éxito, se toma una muestra de 1 mL del precipitado y el sobrenadante (*Prec.Sonic*, *Sb.Sonic*) para analizarlos en una electroforesis SDS-PAGE. La preparación de estas muestras se realiza como se explica en el apartado 4.2.11.

La purificación se lleva a cabo aprovechando las propiedades de solubilidad de los polímeros tipo elastina. El protocolo se esquematiza en la Figura 15.

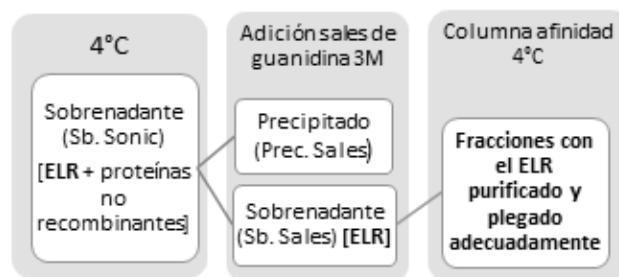


Figura 15. Representación esquemática teórica de la purificación de ELR. Etapa I: salinización de la disolución obtenida tras el sonicado. Etapa II: purificación y correcto plegamiento mediante columna de afinidad.

El precipitado obtenido tras el sonicado (*Prec. Sonic*) se resuspende en 100 mL de agua ultrapura. Se añaden a continuación 100 mL de disolución de sales de guanidina a una concentración de 3M, necesarias para desnaturalizar y solubilizar todas las proteínas, incluso las que se encuentran en los cuerpos de inclusión formados como consecuencia del plegamiento incorrecto de las proteínas. Las sales de guanidina, además, favorecen la ruptura de puentes disulfuro al tener propiedades desnaturalizantes. Esta mezcla se mantiene en agitación durante unas 20 horas a 4 °C. Posteriormente se realiza una centrifugación a 13000 xg y 4 °C durante 1 hora. Se toma una muestra de 1 mL tanto del precipitado (*Prec.Sales*) como del sobrenadante (*Sb.Sales*) para su posterior análisis por electroforesis. Este sobrenadante es el que se llevará a la purificación final en columna de afinidad.

Para la purificación final se aprovechan las propiedades del polímero, en concreto la cola de histidinas que posee, para purificarlo mediante cromatografía en columna de afinidad en condiciones desnaturalizantes, cuya fase sólida contiene una resina recubierta de níquel (Thermo Scientific HisPur™ Ni-NTA Resin). El cromatógrafo utilizado es NGC Quest System (BioRad®). Tras el acondicionamiento previo de la resina de níquel en la columna, se hacen pasar por la misma 2 volúmenes (v/v) de Buffer de equilibrado. Se prepara la muestra añadiéndole su volumen equivalente en Buffer de equilibrado y se hace pasar la proteína a través de la columna. La cola de histidinas que posee el polímero tiene mucha afinidad por el níquel de la fase sólida, lo cual permitirá el empaquetamiento del polímero en la columna. Una vez el polímero se encuentra retenido, se lleva a cabo un gradiente en el cual se comienza desde una concentración máxima de agente desnaturalizante y reductor (Buffer de lavado) hasta reducir completamente su presencia de forma que las condiciones desnaturalizantes desaparezcan y el polímero se pliegue de forma correcta progresivamente en la columna. Por último, el polímero se extrae de la columna utilizando como fase móvil un Buffer de elución que contiene imidazol, cuya afinidad por las histidinas es mayor que la de la fase móvil de la columna. De este modo se obtiene el polímero purificado en las fracciones correspondientes que se extraen de la columna.

El sobrenadante contenido en las fracciones que se obtienen de la columna de afinidad se somete a diálisis en 25 L de agua destilada y ultrapura (4°C) para eliminar los restos de sales de guanidina e imidazol que se han introducido durante el proceso de purificación.

Por último, la disolución se liofiliza (congelación rápida y eliminación del hielo mediante vacío) para obtener el ELR purificado y seco. Se procede entonces a la caracterización físico-química.

4.2.14. Caracterización físico-química de polímeros recombinantes

4.4.14.1. *Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)*

El espectro infrarrojo se forma como consecuencia de la absorción electromagnética de la radiación a frecuencias correspondientes a la vibración del conjunto de enlaces químicos en una molécula³⁸. La técnica se basa en la absorción inducida de la radiación en el rango del infrarrojo por las moléculas que poseen una vibración. Una molécula absorberá la energía de un haz de luz infrarroja cuando dicha energía incidente sea igual a la necesaria para que se dé una transición vibracional. Es decir, la molécula comienza a vibrar a una determinada frecuencia resonante gracias a la energía suministrada por la radiación incidente. Las transiciones producidas en los espectros de IR son transiciones que van del estado fundamental a un nivel superior cercano en energía.

Para que la molécula sea activa en infrarrojo, esta vibración debe inducir un cambio en el momento dipolar de la misma. Los espectros de infrarrojo representan una huella digital de casi cualquier molécula exceptuando aquellas que no posean un momento dipolar distinto de cero, ya que su vibración es completamente simétrica y no es detectable al no presentar cambios en el momento dipolar. El resto de moléculas poseen vibraciones activas que absorben a una longitud de onda concreta en el espectro del infrarrojo.

En este trabajo se utiliza un espectrofotómetro de FT-IR (con transformada de Fourier), cuya característica principal es ser capaz de llevar a cabo un barrido de longitudes de onda utilizando una fuente de radiación infrarroja continua. Esto permite una mayor rapidez y precisión, además de una relación señal-ruido significativamente mejor. La técnica de procesamiento de datos para este tipo de medidas se denomina Transformada de Fourier, que convierte los datos obtenidos en bruto en el espectro deseado³⁹.

La muestra se mide en estado oxidado y reducido con el objetivo de comprobar la presencia de puentes disulfuro intracatenarios. Estos puentes disulfuro, en un medio reductor, se romperán para dar lugar a grupos tiol que pueden ser observados en el espectro de infrarrojo a una longitud de onda de 2950 cm^{-1} . El agente reductor utilizado es un exceso de β -mercaptoetanol.

El equipo utilizado es FT-IR Nicolet iS50 (Thermo Scientific®) con módulos para análisis por ATR y por FAR-IR.

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

La espectrometría de masas es una técnica analítica instrumental de análisis cualitativo y cuantitativo que permite identificar átomos, compuestos sencillos e incluso macromoléculas gracias a la separación de iones desplazados según su relación masa-carga (m/q). Esta técnica proporciona información estructural sobre la molécula analizada, la energía de sus enlaces e incluso información cuántica, isotópica y fisicoquímica.

En este trabajo se utiliza un espectrómetro de masas MALDI-TOF (Bruker Autoflex®) para identificar la estructura del polímero recombinante obtenido tras la purificación y liofilización del mismo. La fuente empleada en el espectrómetro es, por tanto, la denominada de ionización/desorción por láser asistida por matriz (MALDI) combinada con un analizador de tiempo de vuelo (TOF). La fuente MALDI es una fuente blanda, y por tanto idónea para el análisis de biopolímeros, ya que no se produce fragmentación de las moléculas. El analizador de tiempo de vuelo (TOF) es una buena elección a la hora de analizar biopolímeros ya que su rango de relaciones m/q es prácticamente ilimitado (hasta 200-300 kDa).

La prueba se realiza en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de Valladolid. El equipo fue manipulado por técnicos del mencionado laboratorio.

4.2.14.3. *Cromatografía de exclusión molecular en columna*

La cromatografía de exclusión molecular permite separar diferentes componentes según su tamaño molecular en disolución, gracias a la exclusión diferencial de los componentes en las partículas del material empaquetado. Las partículas esféricas que forman la columna tienen poros de un determinado tamaño, por tanto, las moléculas más pequeñas quedarán más retenidas en estos poros eluyendo más lentamente que las moléculas de mayor tamaño que eluirán más rápidamente.

Se utiliza la columna *Superdex75* (GE Healthcare®). El material empaquetado en su interior es una resina denominada Superdex (matriz mezcla de agarosa y dextrano), que combina las propiedades SEC (*size exclusion chromatography*) del dextrano con la estabilidad de la agarosa reticulada, resultando ser una resina con elevada selectividad y resolución.

Para un análisis cualitativo, se introduce en la columna 1 mL de una disolución del ELR utilizando PBS como disolvente.

4.2.14.4. *Espectroscopía DLS (Dynamic Light Scattering)*

La técnica de dispersión de luz dinámica o DLS (*Dynamic light scattering*) es una técnica usada clásicamente para medir el tamaño de partículas en la región sub-micrónica dispersas en un líquido. Los sistemas modernos tienen tanta sensibilidad que pueden ser utilizados para medir el tamaño de macromoléculas en disolución, por ejemplo, proteínas.

Esta técnica se basa en la medida del movimiento browniano de las partículas en relación a su tamaño. El movimiento browniano es el movimiento aleatorio de las partículas debido al bombardeo de las moléculas de disolvente que las rodean. A mayor tamaño de partícula o molécula, más lento es el movimiento browniano ya que se ven menos afectadas por el mencionado bombardeo. Es necesario realizar las medidas a temperatura conocida para un control eficaz de la viscosidad y las corrientes de convección, que podrían afectar al valor obtenido. También se han de tener en cuenta la fuerza iónica del medio y la estructura superficial molecular.

Para calcular este tamaño, se mide la velocidad a la que las partículas se difunden por movimiento browniano determinando la velocidad a la que fluctúa la intensidad de la luz cuando se detecta utilizando una disposición óptica adecuada. La obtención del valor del diámetro hidrodinámico se

la partícula se obtiene mediante un sistema de correlación que compara la señal obtenida en diferentes intervalos de tiempo. La señal va cambiando en cada instante y, al ser aleatoria, la correlación (la similitud entre señales) disminuirá con respecto a la señal original hasta llegar a cero. El tiempo que esta correlación tarda en decaer está relacionado con el tamaño de la partícula: partículas grandes provocarán cambios lentos en la señal, y partículas pequeñas provocarán cambios rápidos ya que se mueven más rápidamente⁴⁰.

Se realizan medidas para los polímeros VOK y P12VOKH6, y para el poliplexo formado por ambos polímeros y un plásmido estabilizado. Para obtener este poliplexo se mezclan los componentes en las proporciones que se desea medir, se aplica un vórtex y se mantiene durante 1 hora a temperatura ambiente. Se forma así la nanopartícula formada por interacciones electrostáticas obteniendo un poliplexo estable.

La prueba se realiza en un equipo Zetasizer Nano (Malvern®) el centro CARTIF del Parque Tecnológico de Boecillo (Valladolid).

4.4.14.5. Espectroscopía de Resonancia magnética nuclear (RMN)

La resonancia magnética nuclear o RMN es una técnica espectroscópica que estudia el comportamiento de ciertos núcleos atómicos que son magnéticamente activos (aquellos que poseen spin nuclear distinto de cero) en presencia de un campo magnético externo. Dicho campo magnético genera un desdoblamiento de los niveles energéticos degenerados del spin nuclear, de modo que se inducen transiciones entre ellos como consecuencia de la absorción de una radiación electromagnética concreta. La disposición de los niveles de energía es función de la naturaleza de los núcleos, su entorno electrónico y las interacciones entre ellos.

La resonancia magnética nuclear es la herramienta más poderosa de la que se dispone para la determinación de una estructura orgánica. Muchas estructuras se pueden determinar exclusivamente por sus espectros de RMN, aunque es frecuente utilizarla conjuntamente con otras técnicas espectroscópicas.

El equipo utilizado consta de dos espectrómetros de RMN de 500 y 400 Hz de Agilent Technologies. El equipo fue manipulado por técnicos del Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) del Parque Tecnológico de la Universidad de Valladolid.

Se analizan el polímero sintetizado P12VOKH6 y también el polímero VOK, para realizar un análisis comparativo. Se analiza 12 mg de polímero disuelto en 0.6 µL de agua deuterada, para una concentración final de 20mg/mL.

4.4.14.6. Análisis de aminoácidos por HPLC

La cromatografía por HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia o *high performance liquid chromatography*) es un tipo de cromatografía en columna utilizada para separar componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias a analizar y la columna cromatográfica. Esta técnica se ha convertido en un procedimiento estándar para la separación de aminoácidos utilizando sistemas de derivatización de los mismos en columna de fase

inversa. Esta derivatización puede ser pre-columna o post-columna y está optimizada para cada tipo de aminoácido, ya sean alifáticos, aromáticos, etc.⁴¹

En este trabajo se utiliza para determinar la secuencia de aminoácidos del polímero P12VOKH6.

El ensayo se lleva a cabo en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de Valladolid. El equipo, HPLC analítico 1200 Series (Agilent Technologies), fue manipulado por técnicos del mencionado laboratorio.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se llevan a cabo aportaciones a dos proyectos en marcha dentro del grupo de investigación Smart Devices for NanoMedicine: por una parte la síntesis del plásmido recombinante pET7-scFv(EpCAM)-VOK-H6; y, por otra parte, la bioproducción del polímero P12VOKH6. Para ello se utilizan técnicas de Biología molecular e Ingeniería genética.

5.1. CONSTRUCCIÓN DEL GEN pET7-scFv(EpCAM)-VOK-H6

En este trabajo se construye el gen scFv(EpCAM)-VOK-H6 clonado en el vector pET7 (Figura 16) con intención de que pueda ser utilizado en una bioproducción a gran escala del polímero recombinante scFv(EpCAM)-VOK-H6 en trabajos posteriores. Este polímero podrá ser utilizado para formar un poliplexo con aplicaciones biomédicas.

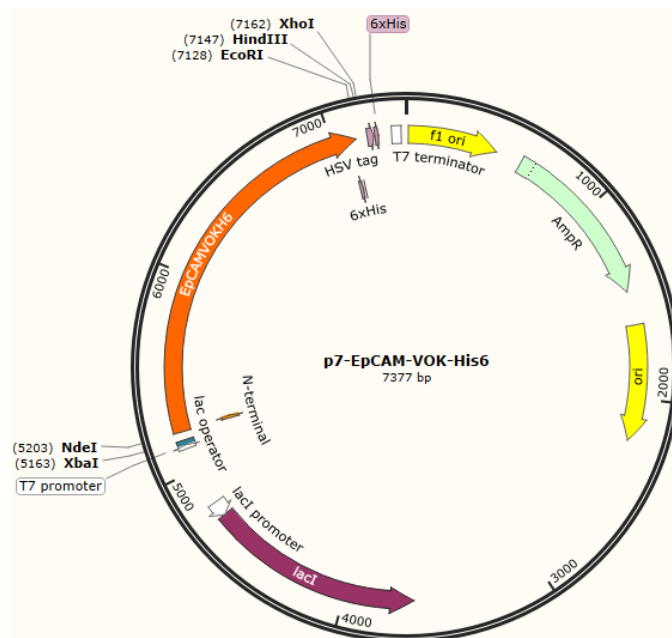


Figura 16. Representación esquemática del gen pET7-scFv(EpCAM)-VOK-H6. Se indican los sitios de corte de las enzimas de restricción HindIII, XbaI, EcoR y NdeI.

El polímero recombinante que codifica este gen es una proteína constituida por tres bloques (Figura 17). El bloque scFv(EpCAM) es un fragmento de anticuerpo que hace las veces de agente de direccionamiento del poliplexo aportando total especificidad al tratamiento ya que reconoce proteínas que se encuentran únicamente en células tumorales y no en células sanas. El bloque VOK tiene la función de autoensamblado, además de aportar al polímero la característica de ser policatiónico, de modo que sea capaz de formar un poliplexo estable con una molécula de DNA con

actividad terapéutica. El bloque H6 tiene la función de permitir la purificación del polímero y es inocuo a la hora de utilizar el polímero en un políplexo como tratamiento biomédico.

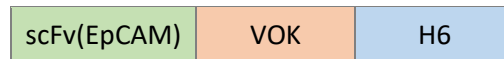


Figura 17. Representación esquemática (no a escala) del polímero scFv(EpCAM)-VOK-H6.

5.2. Descripción de la construcción del gen pET7-scFv(EpCAM)-VOK-H6

La técnica de clonación que se lleva a cabo para la construcción del gen pET7-scFv(EpCAM)-VOK-H6 tiene varias etapas. La primera etapa consiste en hacer lineal el plásmido pDA-H6 (vector de clonación), para lo que se emplea la enzima de restricción *SapI* (Etapa I-Figura 18). Esta enzima tiene un solo sitio de reconocimiento específico en el vector de clonación pDA-H6, así que se obtendrá el plásmido completo lineal con extremos cohesivos. El sitio de reconocimiento se encuentra entre el extremo 5' del bloque que codifica las 6 L-histidinas (H6) y el extremo del vector de clonación adherido a él, por tanto la inserción de fragmentos génicos compatibles que se unen secuencialmente a ambos extremos determinará la formación de un nuevo gen.

Este vector es tratado a continuación con la enzima FastAP (Etapa II-Figura 18), que posee actividad fosfatasa y eliminan el grupo fosfato expuesto en el grupo 5' de la cadena de DNA (*apartado 4.2.3*). Esta defosforilación impide que los extremos del fragmento de DNA vuelvan a unirse de forma espontánea, ya que la forma ciclada es la más estable. El DNA defosforilado podrá unirse a diferentes insertos para dar lugar al plásmido recombinante. Este plásmido linealizado debe purificarse (*apartado 4.2.7.2*) para que la reacción de ligación posterior ocurra de manera precisa e inequívoca sin que se formen otros productos de reacción.

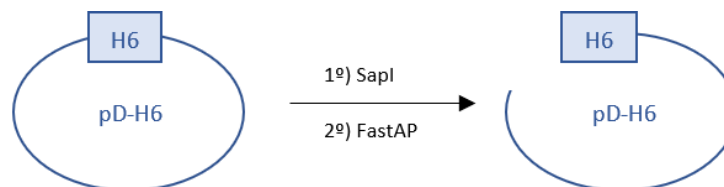


Figura 18. Esquema de la linealización y defosforilación del plásmido pD-H6.

La siguiente etapa se muestra en la Figura 19 y consiste en la inserción del gen VOK en el plásmido pDAH6, anteriormente linealizado, mediante una reacción de ligación. Se parte del gen ya extraído del plásmido que lo contenía y purificado. Para llevar a cabo la reacción de ligación se emplea la enzima T4 DNA ligasa, que es capaz de fusionar los extremos compatibles del plásmido y el inserto para obtener el gen pDA-VOK-H6. Este plásmido se purifica (*apartado 4.2.7.2*) antes de continuar con la siguiente etapa.



Figura 19. Esquema de la reacción de ligación del inserto génico VOK con el plásmido pD-H6, dando lugar al nuevo plásmido recombinante pD-VOK-H6.

El plásmido circular pDA-VOK-H6 obtenido se linealiza utilizando la enzima *SapI* y defosforila utilizando la enzima FastAP de la misma manera que se ha descrito anteriormente, y se realiza una posterior reacción de ligación para introducir el inserto scFv(EpCAM) utilizando la enzima T4 DNA ligasa mediante el procedimiento ya descrito (Figura 20). Tras su purificación (apartado 4.2.7.2), se habrá obtenido el gen pDA-scFv(EpCAM)-VOK-H6.

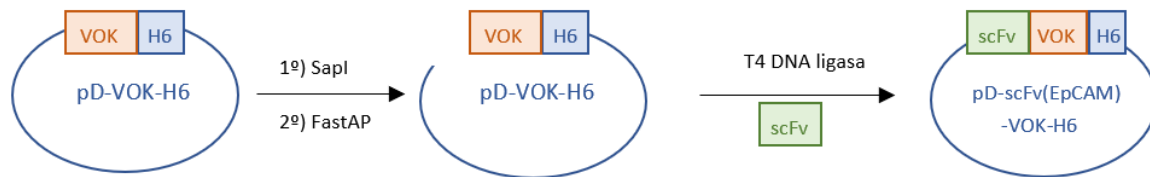


Figura 20. Esquema de la linealización y desfosforilación del plásmido pD-VOK-H6 (Etapa I) y la ligación de dicho plásmido con el inserto génico scFv(EpCAM), dando lugar al nuevo plásmido recombinante pD-scFv(EpCAM)-VOK-H6.

Diseñado el gen que codifica para el polímero que se pretende producir, es necesario extraer el gen scFv(EpCAM)-VOK-H6 del plásmido en el que se encuentra, que es un vector de clonación, e insertarlo mediante una nueva clonación en un vector de expresión. Para ello, primero se extrae el inserto mencionado utilizando la enzima de restricción *EarI*, cuyo sitio de reconocimiento se encuentra entre los extremos del vector y del inserto, de manera que la digestión dará como productos fragmentos de tamaño conocido: el plásmido pDA y el gen de interés. Purificado este gen, se lleva a cabo una ligación utilizando la enzima T4 DNA ligasa para introducir el fragmento scFv(EpCAM)-VOK-H6 en el vector de expresión pET7, que habrá sido anteriormente linealizado, defosforilado y purificado (Figura 21). Tras la purificación del plásmido correspondiente (apartado 4.2.7.2) se habrá obtenido el gen pET7-scFv(EpCAM)-VOK-H6 deseado, preparado para ser producido. Como último paso de la clonación se realiza una transformación con el plásmido obtenido en células competentes NZY5 α (apartado 4.2.5.1) y se realiza un cultivo bacteriano (apartado 4.2.6) con el objetivo de comprobar posteriormente que la clonación ha ocurrido de forma satisfactoria mediante una digestión y una electroforesis analítica.

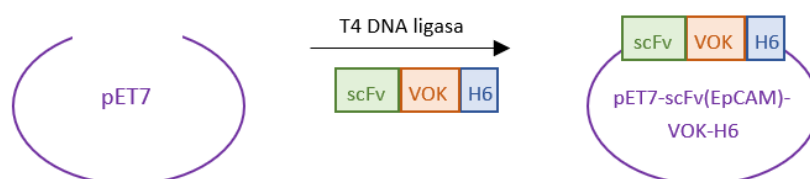


Figura 21. Esquema de la ligación del plásmido pET7 linealizado y desfosforilado con el inserto génico scFv(EpCAM)-VOK-H6, dando lugar al nuevo plásmido recombinante pET7-scFv(EpCAM)-VOK-H6.

El éxito de todos los pasos descritos en este apartado ha de comprobarse mediante electroforesis de DNA en gel de agarosa (apartado 4.2.1.1) y por secuenciación (apartado 4.2.10), además de comprobar la concentración de cada fragmento génico purificado (apartado 4.2.9).

5.2.1. Síntesis experimental del gen pET7-scFv(EpCAM)-VOK-H6

La célula procarionta empleada para la clonación descrita es la *E. coli*, puesto que su uso es el más extendido en la mayoría de laboratorios de Biología molecular por su sencillez y por conocerse ampliamente su genoma.

5.2.1.1. Linealización del plásmido pDA-H6

El plásmido circular pDA-H6 de partida se linealiza utilizando la enzima de restricción *SapI*, siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial. Posteriormente se trata con la enzima FastAP para defosforilar los extremos del fragmento linealizado impidiendo que el plásmido se cicle espontáneamente comprometiendo la ligación. Una vez llevadas a cabo las digestiones (Figura 18), se deberá obtener un solo fragmento génico cuya longitud será de 3988 pb. Tras la comprobación de que la digestión ha ocurrido correctamente mediante una digestión analítica, se lleva a cabo una electroforesis preparativa en gel de agarosa (*apartado 4.2.1.1*) cuyo resultado se muestra en la Figura 22.

En el panel A (Figura 22) se observa la banda que corresponde al plásmido pDA-H6 linealizado. En el panel B (Figura 22) se observa que se ha seccionado la banda que corresponde a dicho plásmido. Esta banda se purifica mediante el protocolo *PureLink Quick Gel Extraction* (*apartado 4.2.7.2*). Purificado el plásmido, se determina su concentración mediante el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (*apartado 4.2.9*). La concentración de la disolución es de 27 ng/ μ L.

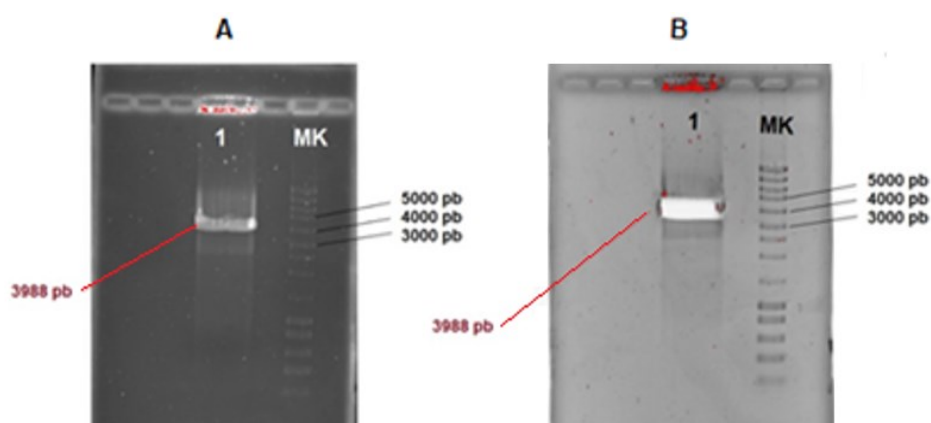


Figura 22. Electroforesis preparativa tras digestión con *SapI* y tratamiento con FastAP del plásmido pDA-H6 en gel de agarosa al 1% (m/v). En el panel A: imagen previa al corte de la banda. En el panel B: imagen tras el corte de la banda. En la calle MK se muestra el marcador NZYLadderIII; y en la calle 1 se observa la banda correspondiente al pDA-H6 lineal y defosforilado.

5.2.1.2. Reacción de ligación del plásmido lineal pDA-H6 y del inserto VOK

Para realizar esta reacción de ligación se parte de la disolución de plásmido pDA-H6 linealizado y purificado en el apartado 5.1.2.1 y una disolución de 3 ng/ μ L del inserto VOK ya purificado. Se realiza la reacción de ligación (*apartado 4.2.4*) representada en la Figura 19.

Tras la reacción de ligación se habrá obtenido el plásmido pDA-VOK-H6 (5068 pb), que se utiliza en la transformación en células competentes NZY5 α (*apartado 4.2.5.1*) y su posterior cultivo (*apartado 4.2.6*) en medio LB-Ampicilina-Kanamicina, ya que el vector de clonación pDA posee un gen que le confiere resistencia a ambos antibióticos. Posteriormente se realiza la extracción y la purificación del DNA plasmídico obtenido mediante el protocolo *NucleoSpin® Plasmid/Plasmid NoLid* (*apartado 4.2.7.1*).

Para comprobar que la reacción de ligación y posterior transformación han ocurrido correctamente se lleva a cabo una digestión analítica de la disolución plasmídica de diferentes colonias con las

enzimas de restricción *EcoRI* y *EcoRI*, cuyos sitios de corte se representan en la Figura 23-A,B. El producto de la digestión se corre en una electroforesis en gel de agarosa (Figura 23 – C).

Se confirma que los procesos han ocurrido correctamente puesto que aparecen las bandas esperadas. Con *EcoRI* aparece una banda a 3837 pb que corresponde a la zona del plásmido sin inserto entre los dos sitios de corte de la enzima, y otra banda a 1231 pb que corresponde al fragmento que contiene el gen VOK-H6 más 100 pb. Por su parte, con *EarI* aparecen todas las bandas correspondientes a los fragmentos de restricción sin inserto (1789, 1262, 637 y 250 pb) y la banda correspondiente a la longitud exacta del gen VOK: 1131 pb.

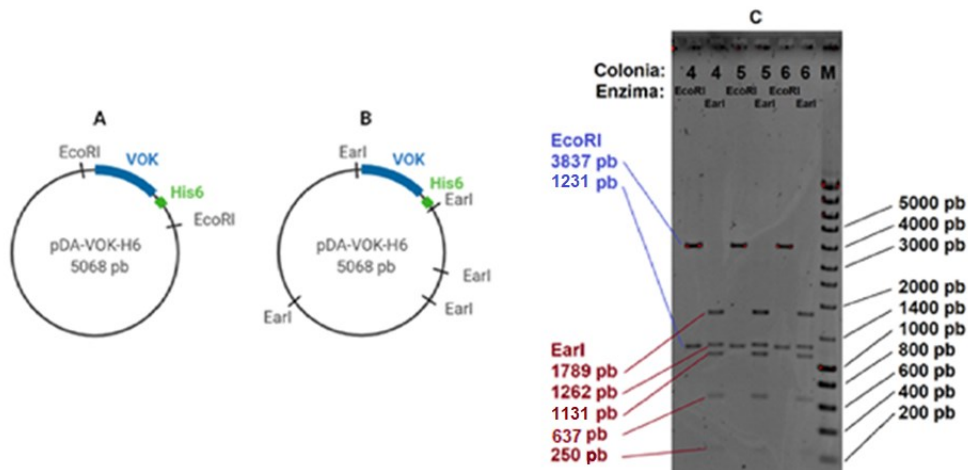


Figura 23. Paneles A y B: Representación esquemática de la digestión de pDA-VOK-H6 con *EcoRI* y *EarI*, respectivamente. Panel C: Electroforesis de digestión analítica con *EcoRI* y *EarI* del plásmido pDA-VOK-H6 en gel de agarosa al 1% (m/v). En la calle M se representa el marcador NZYLadderIII. En las diferentes calles se representan las colonias 4 a 6 digeridas con *EcoRI* y *EarI* distribuidas como se muestra en la imagen.

Por último, se determina la concentración de las disoluciones de las colonias mencionadas (4,5 y 6) por NanoDrop 2000, que resultan ser: 48.79 ng/μL, 38.55 ng/μL y 35.77 ng/μL, respectivamente. Además, se han de analizar estas disoluciones mediante secuenciación automática (*apartado 4.2.10*). Para ello, es necesario que la concentración plasmídica sea mayor, así que se concentra la disolución de la colonia 4 (por tener la concentración más elevada de las tres) hasta obtener una concentración de 68.1 ng/μL.

5.2.1.3. Linealización del plásmido pDA-VOK-H6

El plásmido circular pDA-VOK-H6 obtenido se linealiza utilizando la enzima de restricción *SapI*, siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial. Posteriormente se trata con la enzima FastAP para defosforilar los extremos del plásmido lineal. Una vez llevadas a cabo las digestiones (Figura 20-Etapa I), se deberá obtener un solo fragmento génico cuya longitud será de 5068 pb. Se realiza entonces una electroforesis preparativa en gel de agarosa (*apartado 4.2.1.1*) cuyo resultado se muestra en la Figura 24. Se observan dos bandas más, además de la banda correspondiente al plásmido de interés. Esto se debe a digestiones parciales no deseadas que han ocurrido durante el tratamiento con enzimas provocando una pérdida de rendimiento. En el panel A (Figura 24) se observa la banda que corresponde al plásmido pDA-VOK-H6 linealizado. En el panel B (Figura 24) se observa que se ha seccionado la banda que corresponde a dicho plásmido. Esta banda se purifica mediante el protocolo PureLink Quick Gel Extraction (*apartado 4.2.7.2*).

Purificado el plásmido, se determina su concentración mediante NanoDrop 2000 (*apartado 4.2.9*). La concentración de la disolución es de 12.4 ng/μL.

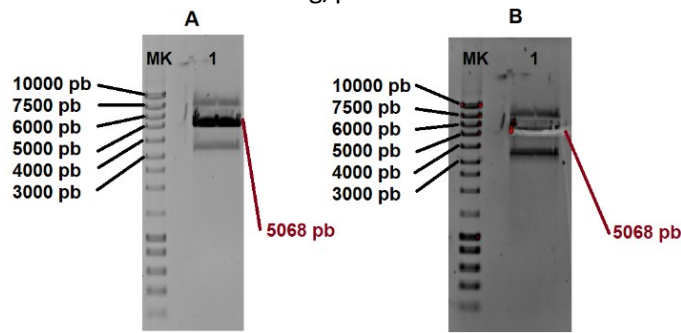


Figura 24. Electroforesis preparativa tras digestión con *SspI* y tratamiento con *FastAP* del plásmido pDA-VOK-H6 en gel de agarosa al 1% (m/v). En el panel A: imagen previa al corte de la banda. En el panel B: imagen tras el corte de la banda. En la calle MK se muestra el marcador NZYLadderIII; y en la calle 1 se observa el pDA-VOK-H6 linealizado y defosforilado.

5.2.1.4. Reacción de ligación del plásmido lineal pDA-VOK-H6 y del inserto scFv(EpCAM)

Para realizar esta nueva reacción de ligación se parte de la disolución de plásmido pDA-VOK-H6 linealizado parcialmente y purificado en el apartado 5.1.2.3 y una disolución de 3 ng/μL del inserto scFv(EpCAM) ya purificado. Se realiza la reacción de ligación (*apartado 4.2.4*) representada en la Figura 20-Etapa II.

Tras la reacción de ligación se obtiene el plásmido pDA-scFv(EpCAM)-VOK-H6 (5830 pb), que se utiliza en la transformación en células competentes NZY5α (*apartado 4.2.5.1*) y su posterior cultivo (*apartado 4.2.6*) en medio LB-Ampicilina-Kanamicina, ya que el vector de clonación pDA posee un gen que le confiere resistencia a ambos antibióticos. Posteriormente se realiza la extracción y la purificación del DNA plasmídico obtenido mediante el protocolo *NucleoSpin® Plasmid/Plasmid NoLid* (*apartado 4.2.7.1*).

Para comprobar que la reacción de ligación y posterior transformación han ocurrido correctamente se lleva a cabo una digestión analítica de la disolución plasmídica de varios clones con las enzimas de restricción *EarI* y *EcoRI*, cuyos sitios de corte se representan en la Figura 25-A,B. El producto de la digestión se separa en una electroforesis en gel de agarosa (Figura 25 – C).

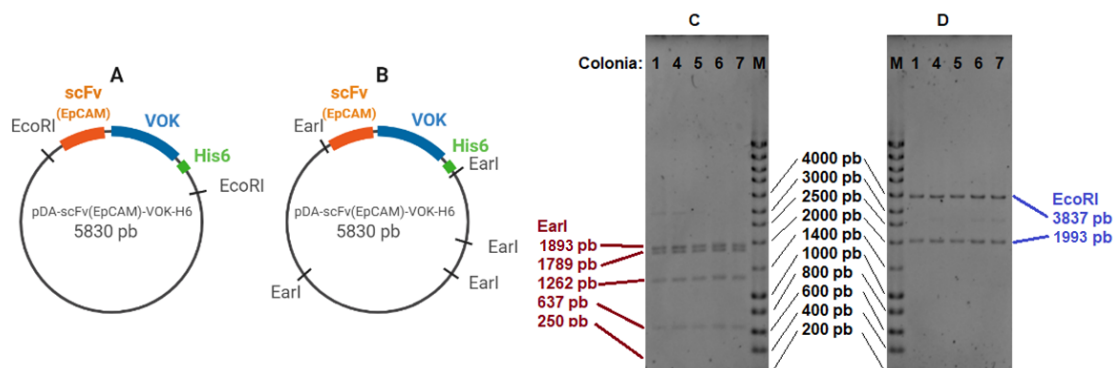


Figura 25. Paneles A y B: Representación esquemática de la digestión de pDA-scFv(EpCAM)-VOK-H6 con *EcoRI* y *EarI*, respectivamente. Panel C: Electroforesis de digestión analítica con *EcoRI* y *EarI* del plásmido pDA-scFv(EpCAM)-VOK-H6 en gel de agarosa al 1% (m/v). En la calle M se representa el marcador NZYLadderIII. En las diferentes calles se representan las colonias 1, 4-7 digeridas con *EcoRI* y *EarI* distribuidas como se muestra en la imagen.

Se confirma que los procesos han ocurrido correctamente en las colonias 1, 4-7 puesto que aparecen las bandas esperadas. Con *EcoRI* aparece una banda a 3837 pb que corresponde a la zona del plásmido sin inserto entre los dos sitios de corte de la enzima, y otra banda a 1993 pb que corresponde al fragmento que contiene el gen introducido (scFv(EpCAM)-VOK-H6) más 100 pb. Por su parte, con *EarI* aparecen todas las bandas correspondientes a los fragmentos de restricción sin el gen (1789, 1262, 637 y 250 pb) y la banda correspondiente a la longitud exacta del gen: 1893 pb.

Por último, se determina la concentración de las disoluciones de las colonias mencionadas por NanoDrop 2000, que resultan ser: 84.3 ng/μL, 63.9 ng/μL, 74.2 ng/μL, 64.4 ng/μL y 93.4 ng/μL respectivamente. Además, se analizan estas disoluciones mediante secuenciación automática (*apartado 4.2.10*). Para ello, es necesario que la concentración plasmídica sea al menos de 100 ng/μL, así que se concentra la disolución de la colonia 1 (por tener la concentración más elevada de las tres) hasta obtener una concentración de 100 ng/μL. El resultado de esta secuenciación es satisfactorio ya que se obtiene la secuencia génica esperada, por tanto se puede continuar con el siguiente paso.

5.2.1.5. Escisión del inserto scFv(EpCAM)-VOK-H6 del plásmido pDA

Completada la secuencia del inserto de interés scFv(EpCAM)-VOK-H6, este ha de extraerse del vector de clonación pDA para su introducción posterior en un vector de expresión. Para ello se lleva a cabo una co-digestión con dos enzimas de restricción. Una de ellas es la endonucleasa *EarI*, que tiene la capacidad de escindir el inserto scFv(EpCAM)-VOK-H6 justo por los extremos que unen dicho inserto con el resto del vector plasmídico. La otra enzima a utilizar es *VspI*, que es capaz de cortar por varios sitios de corte el fragmento restante de plásmido de 1789 pb para que este no se confunda con el inserto al ser sus tamaños similares. Se puede observar una representación de los sitios de corte de esta enzima en la Figura 26-A.

Una vez llevada a cabo la digestión, se obtiene, entre otros, un fragmento génico cuya longitud es de 1893 pb. Tras la comprobación de que la digestión ha ocurrido correctamente mediante una digestión analítica, se lleva a cabo una electroforesis preparativa en gel de agarosa (*apartado 4.2.1.1*) cuyo resultado se muestra en la Figura 26-B,C.

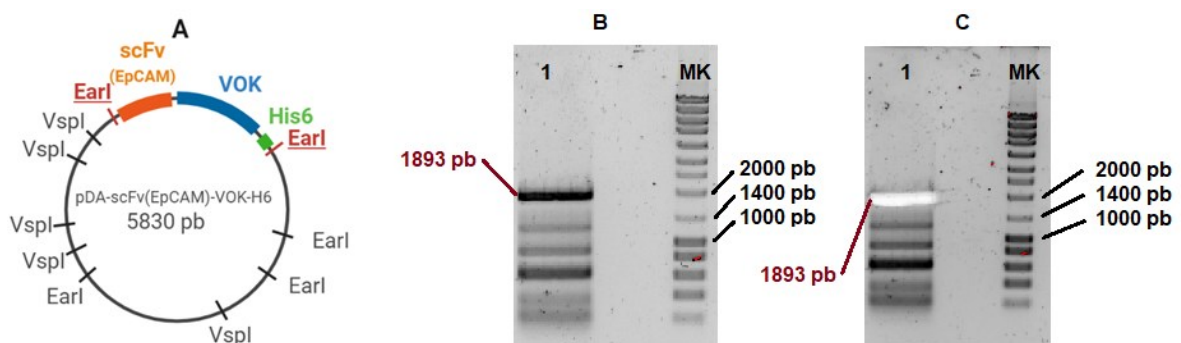


Figura 26. Panel A: Representación esquemática de la digestión de pDA-scFv(EpCAM)-VOK-H6 con *EarI* y *VspI*. Paneles B y C: Electroforesis de co-digestión preparativa con *EcoRI* y *VspI* del plásmido pDA-scFv(EpCAM)-VOK-H6 en gel de agarosa al 1% (m/v). En la calle MK se representa el marcador NZYLadderIII. En las calles marcadas como 1 se observa el inserto scFv(EpCAM)-VOK-H6, antes (B) y después (C) de cortar la banda en el gel.

En el panel B (Figura 26) se observa la banda que corresponde al inserto scFv(EpCAM)-VOK-H6. En el panel C (Figura 26) se observa que se ha seccionado la banda que corresponde a dicho inserto. Esta banda se purifica mediante el protocolo PureLink Quick Gel Extraction (*apartado 4.2.7.2*).

Purificado el inserto, se determina su concentración mediante NanoDrop 2000 (*apartado 4.2.9*). La concentración de la disolución es de 9.6 ng/μL.

5.2.1.6. Reacción de ligación del plásmido pET7 y del inserto scFv(EpCAM)-VOK-H6

Una vez obtenido el plásmido modificado, este debe introducirse en un vector de expresión con el objetivo de realizar una bioproducción posterior a gran escala. Para ello se parte de la disolución del inserto purificado scFv(EpCAM)-VOK-H6 a una concentración de 9.6 ng/μL (*apartado 5.1.2.5*) y del vector plasmídico pET7, ya lineal y defosforilado, a una concentración de 10 ng/μL. Se realiza la reacción de ligación (*apartado 4.2.4*) representada en la Figura 21.

Tras la reacción de ligación se habrá obtenido el plásmido pET7-scFv(EpCAM)-VOK-H6 (7377 pb), que se utiliza en la transformación en células competentes NZY5α (*apartado 4.2.5.1*) y su posterior cultivo (*apartado 4.2.6*) en medio LB-Ampicilina, ya que el vector de clonación pET7 posee un gen que le confiere resistencia a este antibiótico. Posteriormente se realiza la extracción y la purificación del DNA plasmídico obtenido mediante el protocolo *NucleoSpin® Plasmid/Plasmid NoLid* (*apartado 4.2.7.1.1*).

Para comprobar que la reacción de ligación y posterior transformación han ocurrido correctamente se lleva a cabo una co-digestión analítica de la disolución plasmídica con las enzimas de restricción *XbaI* y *EcoRI*, cuyos sitios de corte se representan en la Figura 27-A. El producto de la digestión se corre en una electroforesis en gel de agarosa (Figura 27 – B). Se confirma que los procesos han ocurrido correctamente puesto que aparecen las bandas esperadas. Se observa una banda a 5412 pb que corresponde a la zona del plásmido sin inserto entre los dos sitios de corte de las enzimas, y otra banda a 1965 pb que corresponde al fragmento que contiene el inserto y que contiene el gen introducido (scFvEpCAM-VOK-H6) más 72 pb.

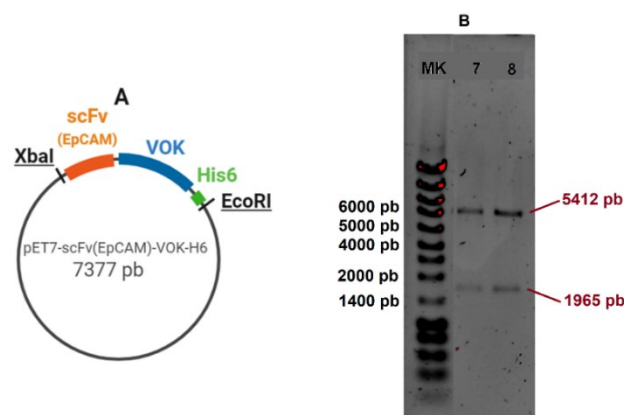


Figura 27. Panel A: Representación esquemática de la co-digestión de pET7-scFv(EpCAM)-VOK-H6 con *EcoRI* y *XbaI*. Panel B: Electroforesis de co-digestión analítica con *EcoRI* y *XbaI* del plásmido pET7-scFv(EpCAM)-VOK-H6 en gel de agarosa al 1% (m/v). En la calle MK se representa el marcador NZYLadderIII. En las diferentes calles se representan las colonias 7 y 8 digeridas con *EcoRI* y *XbaI* distribuidas como se muestra en la imagen.

Por último, se determina la concentración de las disoluciones de las colonias mencionadas (7 y 8) por NanoDrop 2000, que resultan ser: 72.3 ng/μL y 72.5 ng/μL respectivamente. Estos valores son más bajos de lo esperado para un plásmido de expresión. Aun así, los resultados obtenidos son los esperados, se podría comenzar una bioproducción a gran escala del recombinámero sintetizado.

5.3. BIOPRODUCCIÓN DE ELR

En el presente trabajo se ha realizado la bioproducción del recombinámero P12VOKH6, cuyo peso molecular teórico es de 59032 Da. Posteriormente se ha purificado y caracterizado utilizando diferentes técnicas.

Se parte del plásmido recombinante p7-scFv(P12)-VOK-H6 ya purificado en el grupo de investigación Smart Devices for NanoMedicine de la Universidad de Valladolid. El gen que codifica para el polímero que se pretende producir se encuentra en un vector plasmídico de expresión pET, el cual se caracteriza no tanto por producir muchas copias de sí mismo, sino por tener alta tasa de expresión de la proteína recombinante.

5.3.1. Optimización de la bioproducción del recombinámero P12VOKH6

Dado que el polímero es de nueva síntesis, se han requerido ciertos pasos de optimización para determinar las condiciones idóneas para su producción.

El primer paso a realizar es una transformación en células competentes de una cepa bacteriana de expresión. Se han utilizado dos cepas bacterianas diferentes para comprobar cuál de ellas generaba mejores resultados. Por una parte se ha utilizado la cepa bacteriana *SHuffle*[®] *T7 competent E.coli*, que requiere un proceso de inducción con IPTG (*apartado 4.2.5.2*). Esta cepa está modificada por ingeniería genética para promover el plegamiento de la proteína en el citoplasma mediante la formación de puentes disulfuro. Como el polímero a producir requiere de la formación de estos puentes disulfuro para alcanzar su conformación nativa activa, el uso de esta cepa facilita su adecuado plegamiento evitando pasos adicionales tras la purificación. Por otra parte se ha utilizado la cepa *BLR (DE3) competent Cells* en medio autoinductor (*apartado 4.2.5.3*), que es adecuada para la producción de polímeros proteicos, pero que no posee la capacidad de promover el plegamiento post-traducciona que forma los puentes disulfuro. Esto quiere decir que se requieren pasos adicionales para alcanzar la conformación nativa activa del polímero tras la purificación. El cultivo bacteriano para la preparación del inóculo tras la transformación se realiza en medio LB.

La realización de una electroforesis de proteínas SDS-PAGE analítica o *screening* (*apartado 4.2.1.2*) muestra cuál de las colonias bacterianas, aisladas en placas Petri tras la transformación, es la más productora, esto es, qué colonia genera más recombinámero para un tiempo determinado. En la Figura 28-A,B se muestra la mencionada electroforesis en la que se puede observar el contenido proteico en las colonias bacterianas que contienen el ELR, banda señalada con una línea roja, utilizando las dos cepas bacterianas para la transformación.

En la Figura 28-A (cepa *SHuffle*[®] *T7*) se apreció un nivel de producción muy bajo. No se diferenció una banda significativa para la proteína deseada. En la Figura 28-B (cepa *BLR (DE3)*), sin embargo, se observó un nivel de producción notable y se pudo diferenciar la banda significativa para la

proteína deseada. Además se pudo apreciar que la 5 es la que tienen mayor tasa de producción, por tanto se eligió para comenzar la bioproducción.

El control negativo de p7(EI)₂ mencionado en la Figura 28-B se utiliza como guía para observar el patrón de las proteínas que produce la célula y ser capaz de diferenciarlas de la proteína concreta que se pretende expresar a partir del plásmido introducido.

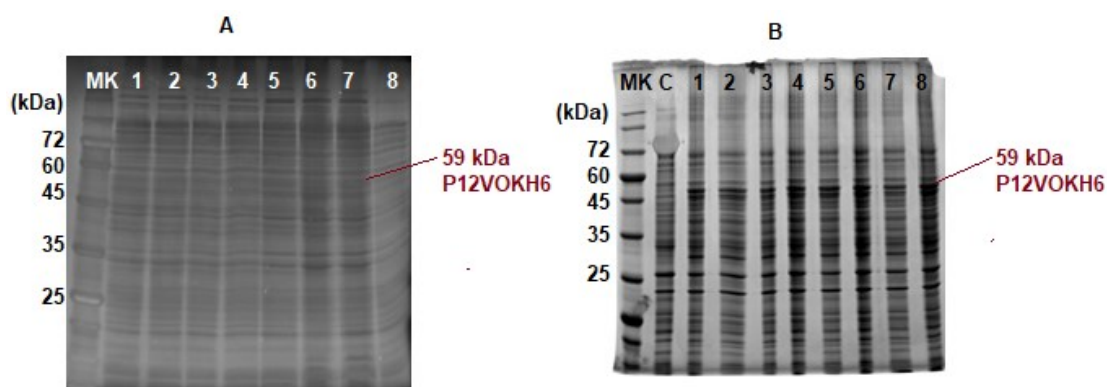


Figura 28. Screening del ELR P12VOKH6 en gel de poliacrilamida al 1%. En la calle MK se observa el marcador de proteínas NZY-Bluesafe®; en la calle C (panel B) se muestra un control negativo de p7(EI)₂; en las calles 1-7 se observan las colonias bacterianas 1-7. Panel A: transformación en cepa SHuffle® T7 competent E.coli. Gel teñido con Azul de Coomassie. Panel B: transformación en cepa BLR (DE3) competent Cells. Gel teñido con cloruro de cobre.

Analizados los resultados anteriores se decidió continuar la bioproducción con la cepa bacteriana BLR(DE3) competent Cells, a pesar de que se requieren pasos adicionales de plegamiento tras la purificación, ya que la producción del ELR es notablemente mayor en esta cepa.

5.3.2. Bioproducción del polímero recombinante

La absorbancia a 600 nm de las diluciones del inóculo, del control y de las muestras a diferentes horas se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Valores de los parámetros medidos durante la bioproducción en Flask.

Muestra	A _{600nm} x10	Dilución (v:v)
Control	7.30	1:10
Inóculo	4.55	1:10
8h (t ₀)	8.36	1:20
8.30h (t ₃₀)	(14.02)	1:20
9h (t ₆₀)	7.54	1:20

Cuando las absorbancias medidas con media hora de diferencia se mantienen prácticamente constantes se para la producción. En este caso se dedujo que el valor de las 8.30h no es concluyente ya que difiere demasiado de los valores anterior y siguiente. Por tanto se toman como válidos los valores de las 8h y de las 9h. En este punto las células se encuentran en fase de crecimiento estacionario. Se realiza una electroforesis SDS-PAGE para confirmar que se ha obtenido el recombinámero correcto en la producción (Figura 29).

En la Figura 29 se puede observar la presencia del polímero P12VOKH6, además de otras bandas significativas. Esto no es preocupante, ya que se espera su desaparición tras la purificación del polímero. El siguiente paso es realizar el lavado de células, su ruptura, el aislamiento del polímero y su purificación (*apartado 4.2.13*).

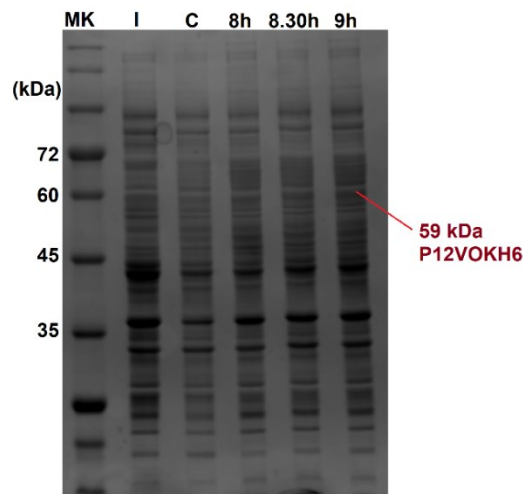


Figura 29. Análisis por electroforesis SDS-PAGE del P12VOKH6 obtenido en la bioproducción. Calle MK: marcador de proteínas NZY-Bluesafe®; Calle I: I inóculo; Calle C: control; Calles posteriores: crudo de la bioproducción a las 8h, 8:30h y 9h. Tinción con Azul de Coomasie.

5.3.3. Purificación del polímero recombinante P12VOKH6

El lisado bacteriano bruto obtenido tras el proceso de sonicación (*apartado 4.2.13*) se somete a una centrifugación cuya función es aislar el polímero contenido en el sobrenadante de los restos celulares obtenidos en el precipitado. Para controlar esta etapa de aislamiento se realiza una electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida (Figura 30) que permite identificar la porción de muestra en la que se encuentra el polímero.

Como se ha indicado en el *apartado 4.2.13*, para obtener el polímero purificado se lleva a cabo una salinización con sales de Guanidina del sobrenadante obtenido tras el sonicado (*Sb. Sonic*) que contiene, además de otras proteínas, el polímero recombinante, que quedará en el sobrenadante por la presencia de estas sales (el aumento de la concentración salina disminuye la temperatura de transición, de modo que puede anularse el entorno proteico hasta hacer solubles los cuerpos de inclusión). Por tanto, tras la centrifugación, se obtiene un sobrenadante (*Sb. Sales*) en el que se espera que esté el polímero. En este punto se lleva a cabo una electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida para controlar que la porción de la muestra en la que se encuentra el polímero es la esperada (Figura 30).

Al analizar la Figura 30 se observó que, en las calles 3 y 4 (correspondientes a la salinización) no aparecían bandas, cuando el resultado esperado era obtener la banda correspondiente al ELR en el sobrenadante (calle 4-Figura 30). Como no se observan bandas en absoluto, pero sí se observan las bandas esperadas en el paso anterior (calles 1 y 2-Figura 30) se dedujo que la elevada concentración de sales de guanidina (3M) interfiere en la electroforesis modificando el campo eléctrico por su carácter electrolítico y alterando la movilidad electroforética de las proteínas. Siendo así, se decidió

asumir que el polímero estaba en el sobrenadante (*Sb. sales*) como se esperaba y proceder a la purificación por columna de afinidad (*apartado 4.2.13.*). En el caso de que en la columna no se observara el comportamiento esperado, significaría que el polímero se encontraba, en contra de lo esperado, en el precipitado (*Prec. sales*).

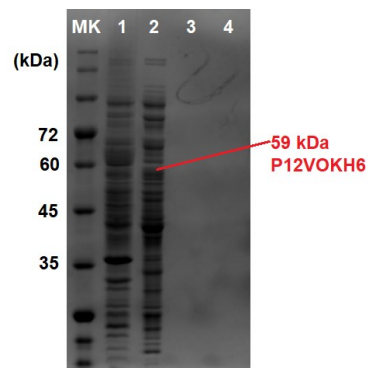


Figura 30. Electroforesis de proteínas de P12VOKH6 obtenido tras la ruptura de células (calles 1 y 2) y la etapa de salinización (calles 3 y 4). En la calle MK se representa el marcador de proteínas NZY-Bluesafe®; en las calle 1 y 2 se representan el precipitado y el sobrenadante tras el sonicado (*Prec. Sonic* y *Sb. Sonic*), respectivamente; en las calles 3 y 4 se representan el precipitado y el sobrenadante tras la salinización con sales de guanidina 3M (*Prec. sales* y *Sb. Sales*), respectivamente. Tinción con Azul de Coomassie.

Tal y como se explica en el apartado 4.2.13, se aprovechan las propiedades de la cola de histidinas que posee el ELR para purificarlo utilizando una columna de afinidad, además de realizar un tratamiento con un gradiente de concentración de sales de Guanidina para favorecer el correcto plegamiento de la proteína mediante la formación de los puentes disulfuro correspondientes.

Al hacer pasar el sobrenadante obtenido (*Sb. sales*) por la columna de afinidad se obtienen 6 fracciones con contenido proteico. El cromatograma obtenido se presenta en la Figura 31. Como se puede observar, los tubos de elución que presentan absorbancia a 280 nm son los que contienen el polímero P12VOKH6.

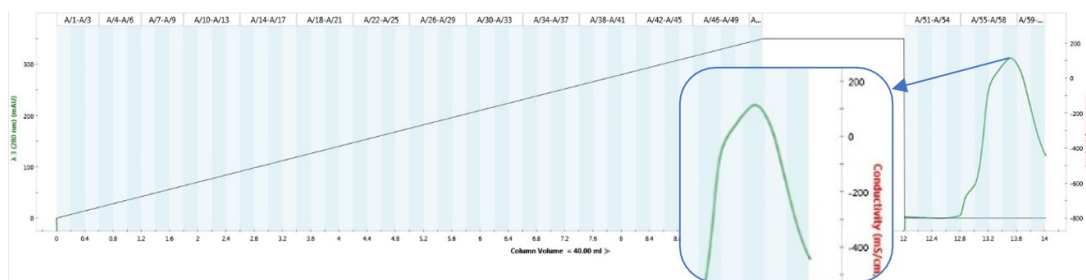


Figura 31. Cromatograma obtenido en la purificación del ELR P12VOKH6 por cromatografía en columna de afinidad (*Thermo Scientific HisPur™ Ni-NTA Resin*). El cromatógrafo utilizado es *NGC Quest System (BioRad®)*. Se destaca la zona en la que se aprecia la elución del polímero P12VOKH6 a 280nm.

Para su adecuado análisis se lleva a cabo una electroforesis de proteínas SDS-PAGE (Figura 32). Se observa una banda por debajo de la banda esperada del ELR de unos 40 kDa cuya intensidad es muy similar a la de la banda del P12VOKH6. Dado que la intensidad de la banda es proporcional a la cantidad de proteína que se encuentra en disolución, esto implica que hay una cantidad muy similar del polímero de interés y de un producto de degradación del propio polímero. Se deduce que se ha producido una degradación por el extremo amino terminal, ya que la columna de afinidad utilizada

permite retener el polímero desde el fragmento de la cola de histidinas, que está en el extremo carboxilo terminal.

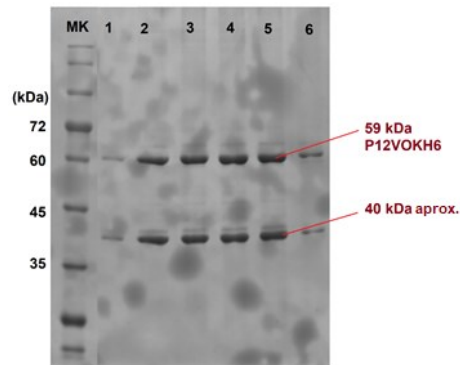


Figura 32. Electroforesis de proteínas SDS-PAGE tras columna de afinidad de P12VOKH6. En la calle MK se observa el marcador de proteínas NZY-Bluesafe®; en las calles 1-6 se observan las fracciones 55 a 60 que se han obtenido de la columna de afinidad al hacer pasar por ella el sobrenadante obtenido tras la adición de sales de Guanidina (Sb. sales). Tinción con Azul de Coomasie.

Que se produzca este tipo de degradación no es deseable, pero aun así no es estrictamente necesario realizar una separación exhaustiva para aislar el polímero de interés, ya que cuando se forma el poliplexo, hay muchas moléculas de polímero policatiónico por cada molécula de DNA, y la presencia de fragmentos proteicos que solo contenga el polímero estructural sin el fragmento de anticuerpo no impide la correcta formación de la nanopartícula. Por lo tanto, se procede a finalizar la purificación llevando a cabo la diálisis para eliminar las sales que se han añadido durante el proceso de purificación. La disolución obtenida se liofiliza para obtener el polímero purificado y seco (*apartado 4.2.13*).

Obtenido el ELR final, su masa es de 32.3 mg. Esto permite calcular un rendimiento de 4.3 mg/L de producto purificado.

5.4. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE ELR

En este trabajo se han utilizado diferentes técnicas de caracterización del polímero bioproducto P12VOKH6. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

5.4.1. FT-IR

El espectro obtenido mediante espectroscopía de infrarrojo para el polímero P12VOKH6, en sus formas oxidada y reducida, se muestra en la Figura 33. Como se explicaba en el *apartado 4.2.14.1.*, se esperaba observar, en la muestra del polímero reducido, un pico a 2950 cm^{-1} indicativo de la presencia de los grupos tiol en las L-cisteínas que forman los puentes disulfuro, lo cual confirmaría la presencia de dichos puentes disulfuro en la forma oxidada de la molécula.

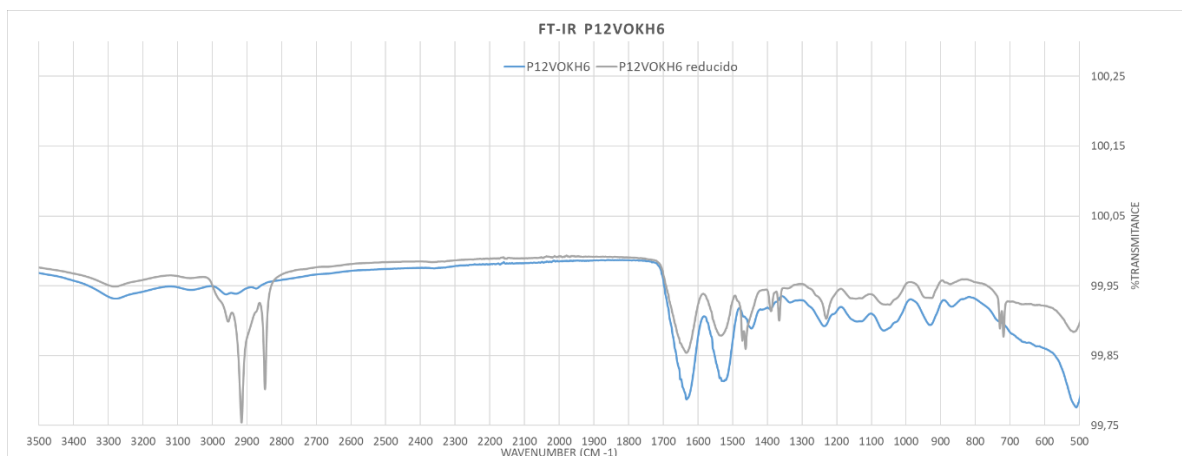


Figura 33. Espectro de FT-IR del recombinámero P12VOKH6 obtenido. Línea azul: P12VOKH6 forma oxidada. Línea gris: P12VOKH6 forma reducida. Se representa el % de transmitancia frente a la longitud de onda en cm^{-1} .

La señal que aparece a 1640 cm^{-1} , común en ambos espectros, corresponde con el enlaces C=O de los grupos carboxilato de los aminoácidos presentes. En el espectro de la forma reducida (Figura 33-Línea gris) se observan tres señales entre 2800 y 3000 cm^{-1} . Las que aparecen a 2850 y 2920 cm^{-1} corresponden a los enlaces S-H de las moléculas de β -mercaptoetanol⁴² en su forma reducida, presente debido al exceso de agente reductor empleado. La señal que aparece a 2950 cm^{-1} es la correspondiente a los enlaces S-H procedentes de la reducción y consecuente ruptura de los puentes disulfuro que unen las L-cisteínas del fragmento proteico scFv(P12). Por lo tanto, se puede concluir que, efectivamente, el polímero se ha plegado como se esperaba formando los puentes disulfuro pertinentes.

5.4.2. Espectrometría de masas: MALDI-TOF

El espectro obtenido mediante espectroscopía de masas para el polímero P12VOKH6 se muestra en la Figura 34. Aparece un pico a 59342 umas (o Dalton) que se corresponde con el ion molecular ya que proporciona el peso molecular del polímero P12VOKH6. Además presenta un pico minoritario a 29895 umas correspondiente al peso molecular de la segunda ionización del polímero. Por otra parte, se observa un pico intenso a 33501 umas. Esta señal confirma la afirmación realizada en el apartado 5.3.3 sobre una posible degradación del polímero. El peso molecular de este producto de degradación se corresponde con el peso molecular del fragmento VOK. Por último, aparece un pico muy leve a 46606 umas, que se asume que es otro producto de degradación cuya concentración es más baja y por eso no se ha observado en la electroforesis SDS-PAGE (Figura 32).

Como conclusión, se asume que se produce una cantidad significativa de degradaciones. Observando las electroforesis anteriores a la purificación (Figuras 28-30), se pueden apreciar levemente las bandas correspondientes al peso molecular de estos productos de degradación, que se habían pasado por alto previamente. Esto quiere decir que la degradación no se produjo en la purificación del polímero, sino que estos productos se sintetizaron ya degradados durante la bioproducción. Esto puede deberse a la presencia de proteasas en la cepa bacteriana.

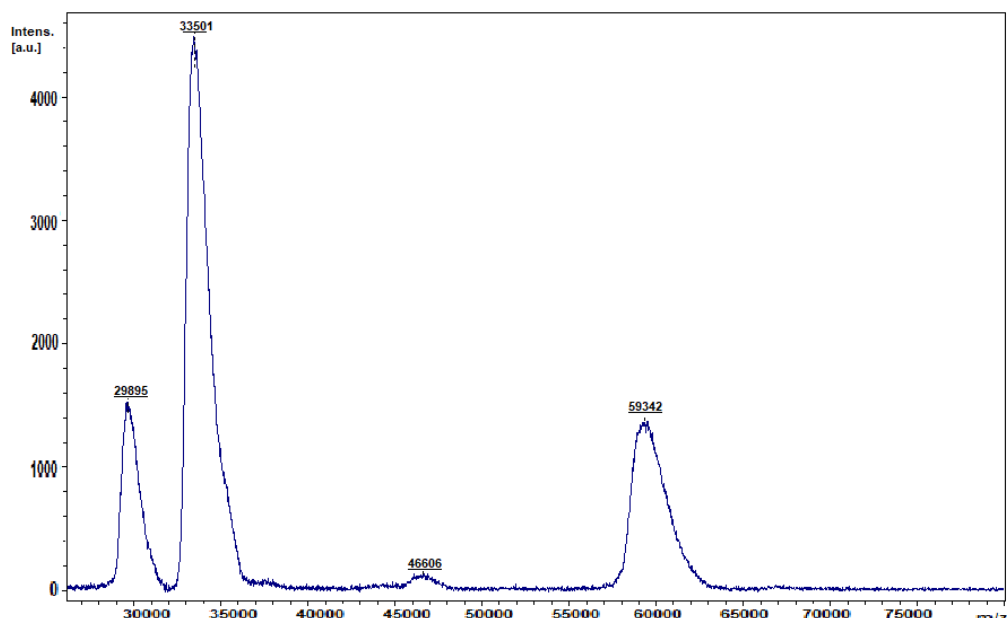


Figura 34. Espectro de masas del polímero P12VOKH6 realizado en un espectrómetro MALDI-TOF (matriz 2,5-DHAP) en agua.

5.4.3. Cromatografía de exclusión molecular en columna

A pesar de que, como se ha explicado en el apartado 5.2.3., no es imprescindible realizar una separación entre el polímero de interés y el degradado, se ha utilizado la cromatografía de exclusión molecular por tamaños para analizar cualitativamente si este aislamiento del polímero P12VOKH6 de sus productos degradado era posible.

El cromatograma obtenido en la columna de exclusión molecular Superdex75 se presenta en la Figura 35. Se observa cómo la muestra es eluida en las fracciones 4-8. Se esperaba obtener una sola señal para el polímero P12VOKH6, sin embargo se observan al menos 3 señales significativas, de las cuales dos se encuentran solapadas. Las señales que eluyen a 8.04 y 9.71 mL, por su destacada intensidad, corresponden a la elución del polímero. Al observar más de una señal en la misma zona, se sospecha que el polímero no se ha separado correctamente de los otros productos obtenidos. La señal de menor intensidad, que eluye a 15.64 mL, es probablemente un producto de degradación cuya concentración es muy baja para ser observado por SDS-PAGE, y que sí ha sido posible separar del P12VOKH6 por esta técnica dado su menor tamaño.

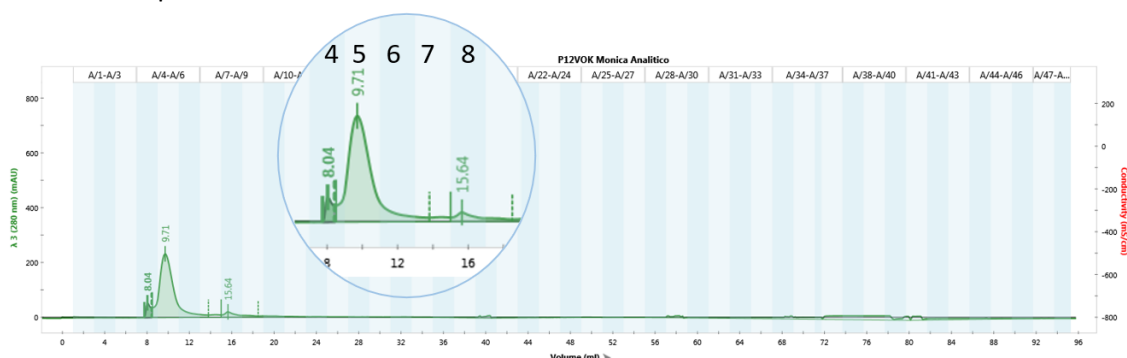


Figura 35. Cromatograma obtenido tras eluir el recombinámero P12VOKH6 en la columna de exclusión molecular Superdex75. Se representa destacada el intervalo de volumen en el que aparece señal de absorción en el cromatograma. Las franjas 4-8 representan las fracciones tomadas en ese intervalo.

Las fracciones obtenidas son analizadas por electroforesis SDS-PAGE (Figura 36-A). Como se puede observar, no se ha conseguido realizar una separación satisfactoria del polímero P12VOKH6 y sus productos de degradación, puesto que ambos polímeros han eluido en su mayoría en la fracción número 5.

Además, se ha realizado una segunda electroforesis SDS-PAGE con el objetivo de comprobar la diferencia de movilidad electroforética entre muestras con y sin agente reductor, pretendiendo demostrar que las proteínas plegadas generan una movilidad electroforética menor y aparecen a pesos moleculares menores.

Para ello se han tomado dos muestra de polímero P12VOKH6 disuelto en agua y concentrado; y dos muestras de la fracción número 5 obtenida a partir de la columna de exclusión molecular para observar su comportamiento al tratarlas con *Protein Loading Buffer* con y sin agente reductor (β -mercaptoetanol). Las muestras se distribuyen como se indica en la Figura 36-B. Se observa que existe un *shift* (representado en amarillo, Figura 36-B) entre las muestras que están en presencia de agente reductor y las que no, debido a que en las primeras el polímero se encuentra completamente desplegado y en las segundas se encuentra plegado.

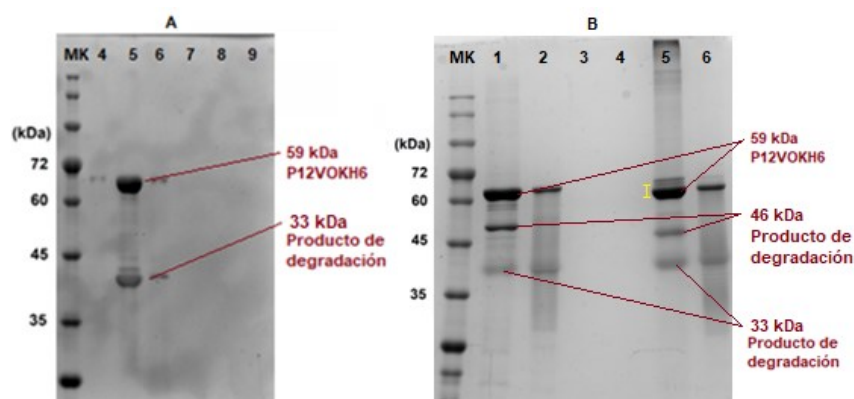


Figura 36. **Panel A:** Electroforesis de proteínas SDS-PAGE tras cromatografía de exclusión por tamaños de P12VOKH6. Calle MK: marcador de proteínas NZY-Bluesafe®. Calles 4-9: fracciones 4-9 obtenidas tras la elución de la columna. **Panel B:** Electroforesis de proteínas SDS-PAGE P12VOKH6. Calle MK: marcador de proteínas NZY-Bluesafe®. Calle 1: muestra de polímero P12VOKH6 concentrado con agente reductor. Calle 2: muestra de la fracción 5 obtenida tras la elución de la columna con agente reductor. Calles 3 y 4 vacías. Calle 5: muestra de polímero P12VOKH6 concentrado sin agente reductor. Calle 6: muestra de la fracción 5 obtenida tras la elución de la columna sin agente reductor. Tinción con Azul de Coomasie.

5.4.4. Espectroscopía DLS (Dynamic light scattering)

Esta técnica se ha utilizado con el objetivo de observar la eficacia del polímero sintetizado P12VOKH6 para formar un poliplexo estable, con una carga superficial positiva capaz de interactuar con la membrana plasmática y de un tamaño adecuado (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados obtenidos en la espectroscopía DLS para VOK, P12VOKH6 y los poliplexos formados con dichos polímeros y moléculas de DNA plasmídico.

	Carga superficial (mV)	Diámetro (nm)	PDI
VOK 1mg/mL	30.6	23.82	0.518
P12VOKH6 1mg/mL	15.2	80.06	0.557

	Carga superficial (mV)	Diámetro (nm) Ratio(P12VOKH6/VOK)	PDi
Poliplexo (DNA+VOK)	35.6	Rt1/9: 159.0 Rt1/4: 181.9	0.586 0.416
Poliplexo (DNA+P12VOKH6)	26.8	Rt1/2: 243.2	0.496

Se han probado diferentes ratios de la mezcla P12VOK/VOK para ver cuál consigue complejar mejor el DNA plasmídico. Todas las pruebas se realizan con una cantidad fija de 2 µg de pDNA y un ratio 50:1 de lisinas frente a fosfatos, optimizado previamente por el grupo Smart Devices for NanoMedicine⁴³.

Ya que el P12VOK se produce con una degradación de aproximadamente el 50%, el ratio ½ es el de partida obtenido al disolver el polímero liofilizado, los ratios ¼ y 1/9 se consiguen mezclando el P12VOK con VOK en la medida adecuada. El ratio ¼ resulta ser el más prometedor, ya que la nanopartícula tiene un tamaño adecuado entre 150 y 180 nm (181.9 nm) y la polidispersidad (amplitud del pico que da una idea de la homogeneidad de la muestra), aun siendo elevada, es la menor de las tres (se considera adecuado un valor de pDi inferior a 0.2).

En la Figura 37 se observa una gráfica que representa las tres medidas de la muestra de P12VOK/VOK con ratio ¼ formando un poliplexo con DNA plasmídico. El pequeño pico de la izquierda corresponde al polímero que no ha sido capaz de complejarse por estar en exceso o por causas de impedimento estérico. Esta es la razón por la que la polidispersidad supera el valor adecuado: la falta de homogeneidad en la muestra se debe a la presencia de polímero sin complejar. Esto podría mejorarse optimizando aún más los ratios polímero/plásmido.

El ratio 50/1 de lisinas y fosfatos utilizado con otros polímeros policatiónicos en trabajos anteriores puede no ser el adecuado cuando se tiene el scFv que puede ocasionar impedimentos estéricos y no dejar que las moléculas de polímero interaccionen correctamente con el plásmido.

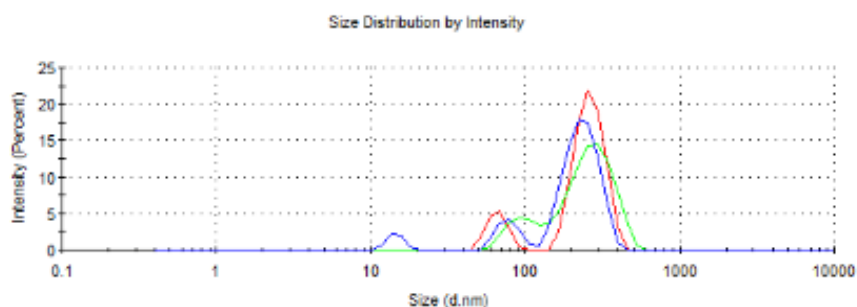


Figura 37. Gráfica obtenida en el equipo DLS. Se observan las tres medidas realizadas de la muestra P12VOK/VOK con ratio ¼ complejado con DNA plasmídico.

5.4.5. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros obtenidos por ¹H-RMN se pueden observar en el Anexo I (Figuras 38-41). En la Tabla 8 se resumen los datos esperados (según las predicciones obtenidas utilizando el software Chemdraw (PerkinElmer®)) y obtenidos experimentalmente para los polímeros VOK y P12VOKH6.

En los espectros experimentales obtenidos se ha utilizado como referencia el número de protones de CH₃ (0.96 ppm) para normalizar el resto de integrales.

Tabla 8. Datos esperados y obtenidos para el espectro de RMN de los polímeros VOK y P12VOKH6 en D₂O.

Polímero		-H aromáticos	-X-CH ; O=C-H	CH, CH ₂	CH ₃
	δ	7-8 ppm	2.6-4.8 ppm	1.2-2.4 ppm	0.96 ppm
VOK	nº H teórico	0	648	720	432
	nº H experimental	0	656	782	432
P12VOKH6	nº H teórico	115	1370	1135	813
	nº H experimental	156	1222	1425	813

Como se puede observar en la Tabla 8, los valores teóricos y experimentales son similares en ambos polímeros. Los resultados permiten afirmar que el polímero obtenido tiene la composición química esperada y que, en el P12VOKH6, se ha incorporado el fragmento de scFv(P12). Esto puede afirmarse dado que este fragmento, a diferencia del VOK aislado, posee aminoácidos con grupos aromáticos (Figura 40) que se observan únicamente en el espectro del polímero completo.

El hecho de que el número de protones de cada tipo obtenidos experimentalmente difiera más del número teórico en el caso del P12VOKH6 que en el caso del VOK, se debe a que las predicciones teóricas para el VOK en el software utilizado son más precisas al ser una secuencia corta repetida. En el caso del polímero completo solo es posible realizar una estimación del desplazamiento químico de los protones en aminoácidos aislados sin tener en cuenta su entorno químico. Esto provoca que el error al realizar las estimaciones aumente.

5.4.6. Análisis de aminoácidos por HPLC

En la Tabla 9 se representan los resultados esperados a partir de la secuencia teórica de aminoácidos, y los resultados experimentales obtenidos por HPLC. Se puede afirmar que los resultados teóricos y los obtenidos experimentalmente son suficientemente similares para concluir que la composición en aminoácidos del polímero P12VOKH6 es la esperada.

Tabla 9. Resultado análisis de aminoácidos teórico y experimental (HPLC) del recombinámero P12VOKH6.

Aminoácido	%masa	nº experimental	nº teórico
Asp+Asn	2.86	15.07	4+5
Glu+Gln	4.33	20.62	8+14
Ser	3.11	20.71	29
His	1.90	8.78	6
Gly	21.86	204.3	192
Thr	1.82	10.73	17
Arg	2.53	10.17	13
Ala	1.98	15.53	16
Tyr	2.99	11.56	12
Cys	2.05	5.99	4
Val	15.91	95.14	92
Met	0.53	2.50	3
Trp	1.11	3.80	4
Phe	1.31	5.55	7
Ile	0.92	4.90	7
Leu	3.10	16.55	20
Lys	17.91	85.60	82
Pro	13.79	83.95	84

6. CONCLUSIONES

1. Se ha diseñado un vector plasmídico recombinante que codifica un nuevo polímero proteico para aplicaciones biomédicas: scFv(EpCAM)-VOK-H6. Este polímero es capaz de formar nanoestructuras en forma de poliplexos estables capaces de albergar en su interior moléculas de DNA con funciones terapéuticas. Para funcionalizar y dirigir el polímero y el poliplexo, se ha integrado en la secuencia génica del plásmido el anticuerpo scFv(EpCAM). Estos procesos han sido controlados por técnicas de análisis para asegurar su correcta realización.
2. Se ha bioproducido un nuevo polímero tipo elastina para aplicaciones biomédicas: P12VOKH6. Este polímero es capaz de formar nanoestructuras en forma de poliplexos estables capaces de albergar en su interior moléculas de DNA con funciones terapéuticas. El polímero posee un fragmento proteico del anticuerpo scFv(P12), lo cual permite una terapia génica dirigida a células específicas.
3. Se ha escogido la colonia que producía más cantidad de polímero y se ha realizado un cultivo de 7.5L a partir de dicha colonia para obtener grandes cantidades del polímero P12VOKH6. Este proceso se ha seguido mediante un control exhaustivo de los parámetros que lo regían. Sin embargo, el rendimiento obtenido no ha sido tan alto como se esperaba.
4. Como método de purificación del ELR sintetizado, se ha utilizado una columna de afinidad. Este proceso ha sido crucial para el correcto plegamiento del polímero, obteniéndolo así en su conformación nativa (activa).
5. La purificación no ha ocurrido de manera totalmente satisfactoria ya que, a pesar de haber obtenido el polímero deseado, se tiene evidencia de la presencia de polímeros secundarios, productos de la degradación del primero. No ha sido posible aislar el polímero P12VOKH6 del producto degradado, pero se ha de tener en cuenta que las aplicaciones biomédicas para las que se ha diseñado el ELR pueden ser llevadas a cabo en estas condiciones.
6. Se ha llevado a cabo una caracterización físico-química del polímero mediante diferentes técnicas: electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), espectroscopía de infrarrojo (FT-IR), espectrometría de masas (MALDI-TOF), dispersión dinámica de la luz (DLS), cromatografía en fase sólida de exclusión por tamaños, resonancia magnética nuclear (RMN) y análisis de aminoácidos por HPLC.

7. PERSPECTIVAS DE FUTURO

Se espera de trabajos posteriores la bioproducción del polímero scFv(EpCAM)-VOK-H6 codificado por el plásmido recombinante diseñado en este trabajo. Sería interesante en próximos estudios determinar la funcionalidad de dicho polímero como posible terapia dirigida específica para la destrucción de células tumorales en cánceres de colon en humanos.

Observado el bajo rendimiento en la bioproducción del polímero P12VOKH6, sería conveniente llevar a cabo una optimización del proceso con el objetivo de mejorar el rendimiento y la calidad de la purificación. Por otra parte, dada la notable cantidad de productos de degradación obtenidos en la bioproducción, sería interesante el estudio de otras cepas bacterianas que carezcan de las proteasas que puedan estar degradando el polímero.

Por último, sería interesante estudiar la funcionalidad del polímero tipo elastina P12VOKH6 sintetizado en este trabajo como posible terapia dirigida específica para la destrucción de células tumorales en cánceres de mama en humanos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Herráez, A.; Luque, J. Texto Ilustrado e Interactivo de Biología Molecular e Ingeniería Genética. 2001, p 467.
- (2) Bodine, D. M. National Human Genome Research Institute (NHGRI) <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Ingenieria-genetica> (accessed Jun 4, 2021).
- (3) Aggarwal, R.; Targotra, M.; Kumar, B.; Sahoo, P. ; Chauhan, M. K. Polyplex: A Promising Gene Delivery System. *Int. J. Pharm. Sci. Nanotechnol.* **2019**, *12* (6), 4681–4686.
- (4) Sung, Y. K.; Kim, S. W. Recent Advances in the Development of Gene Delivery Systems. *Biomater. Res.* **2019**, *23* (1), 1–7.
- (5) Girotti, A. Desarrollo de Una Plataforma Biotecnológica Para La Obtención de Polímeros Recombinantes Tipo Elastina, Universidad de Valladolid, 2007.
- (6) Díez, S. R. Síntesis y Caracterización de Polímeros Recombinantes Tipo Elastina Para Aplicaciones Biomédicas, Universidad de Valladolid, 2020.
- (7) Encyclopedia Britannica <https://www.britannica.com/science/polymer> (accessed Jun 5, 2021).
- (8) Libraries, C. D. N. a. Gene Cloning Gene Cloning. **1979**, *0* (1), 1–3.
- (9) S. Rauscher, R. P. The Liquid Structure of Elastin. *Elife* **2017**, e262526.
- (10) Reiersen, H.; Clarke, A. R.; Rees, A. R. Short Elastin-like Peptides Exhibit the Same Temperature-Induced Structural Transitions as Elastin Polymers: Implications for Protein Engineering. *J. Mol. Biol.* **1998**, *283* (1), 255–264.
- (11) Suzanne M. Mithieux, A. S. W. Elastin. *Adv. Protein Chem.* **2005**, *70* (04), 437–453.
- (12) Kowalczyk, T.; Hnatuszko-Konka, K.; Gerszberg, A.; Kononowicz, A. K. Elastin-like Polypeptides as a Promising Family of Genetically-Engineered Protein Based Polymers. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *30* (8), 2141–2152.
- (13) Urry, D. W. Entropic Elastic Processes in Protein Mechanisms. I. Elastic Structure Due to an Inverse Temperature Transition and Elasticity Due to Internal Chain Dynamics. *J. Protein Chem.* **1988**, *7* (1), 1–34.
- (14) P. Dawson, T. Muir, I. Clarke-Lewis, S. K. Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. *Science (80-)*. **1994**, *266*, 776–779.
- (15) Deming, T. J. Living Polymerization of α -Amino Acid-N-Carboxyanhydrides. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2000**, *38* (17), 3011–3018.
- (16) Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (14), 2149–2154..
- (17) Zhang, X.; Urry, D. W.; Daniell, H. Expression of an Environmentally Friendly Synthetic Protein-Based Polymer Gene in Transgenic Tobacco Plants. *Plant Cell Rep.* **1996**, *16* (3–4), 174–179.
- (18) Duro-Castano, A.; Conejos-Sánchez, I.; Vicent, M. J. Peptide-Based Polymer Therapeutics. *Polymers (Basel)*. **2014**, *6* (2), 515–551.
- (19) Rodríguez-Cabello, J. C.; Reguera, J.; Girotti, A.; Arias, F. J.; Alonso, M. Genetic Engineering of Protein-Based Polymers: The Example of Elastinlike Polymers. *Adv. Polym. Sci.* **2006**, *200* (1), 119–167.
- (20) Machado, R.; Ribeiro, A. J.; Padrão, J.; Silva, D.; Nobre, A.; Teixeira, J. A.; Arias, F. J.; Cunha, A. M.; Rodríguez-Cabello, J. C.; Casalla, M. Exploiting the Sequence of Naturally Occurring Elastin: Construction, Production and Characterization of a Recombinant Thermoplastic

- Proteinbased Polymer. *J. Nano Res.* **2009**, *6*, 133–145..
- (21) Rodríguez-Cabello, J. C.; Girotti, A.; Ribeiro, A.; Arias, F. J. Synthesis of Genetically Engineered Protein Polymers (Recombinamers) as an Example of Advanced Self-Assembled Smart Materials. *Methods Mol. Biol.* **2012**, *811*, 17–38.
 - (22) Rodríguez-Cabello, J. C.; González de Torre, I.; Ibañez-Fonseca, A.; Alonso, M. Bioactive Scaffolds Based on Elastin-like Materials for Wound Healing. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, *129*, 118–133.
 - (23) Gómez, J. R. Estudio de La Transición Inversa Con La Temperatura En Polímeros Tipo Elastina Con Creciente Funcionalidad. **2004**, 233.
 - (24) Lächelt, U.; Wagner, E. Nucleic Acid Therapeutics Using Polyplexes: A Journey of 50 Years (and Beyond). *Chem. Rev.* **2015**, *115* (19), 11043–11078.
 - (25) Elouahabi, A.; Ruyschaert, J. M. Formation and Intracellular Trafficking of Lipoplexes and Polyplexes. *Mol. Ther.* **2005**, *11* (3), 336–347.
 - (26) Costa, J. Cancer <https://www.britannica.com/science/cancer-disease> (accessed Jun 6, 2021).
 - (27) M^aAuxiliadora Romero Falcón, Rosa M^a Sánchez Gil, Á. G. C. Cribado y Diagnóstico Precoz Del Cáncer de Pulmón. **2017**, *29* (2), 27–34.
 - (28) Susanivar, H.; Rosario, C. Eficacia Del Cribado Del Cáncer Colorrectal En La Reducción De La Mortalidad En Personas Adultas. **2018**.
 - (29) Zudaire, I.; Pío, R.; Martín-Subero, I.; Lozano, M. D.; Blanco, D.; García López, J. J.; De Dios, O.; Rey, N.; Zulueta, J.; Siebert, R.; Calasanz, M. J.; Montuenga, L. Desarrollo de La Técnica de FICTION Como Nueva Herramienta Para El Diagnóstico Precoz de Cáncer de Pulmón. *An. Sist. Sanit. Navar.* **2002**, *25* (3), 305–315.
 - (30) Chakraborty, S.; Rahman, T. The Difficulties in Cancer Treatment. *Ecancermedicalscience* **2012**, *6*, ed16.
 - (31) Giacca, M.; Zacchigna, S. Virus-Mediated Gene Delivery for Human Gene Therapy. *J. Control. Release* **2012**, *161* (2), 377–388. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.008>.
 - (32) Cerritelli, S. M.; Crouch, R. J. Ribonuclease H: The Enzymes in Eukaryotes. *FEBS J.* **2009**, *276* (6), 1494–1505.
 - (33) Brack, S. S.; Silacci, M.; Birchler, M.; Neri, D. Tumor-Targeting Properties of Novel Antibodies Specific to the Large Isoform of Tenascin-C. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12* (10), 3200–3208.
 - (34) M. Mokhtari, Z. Z. Expression in Colon Adenocarcinoma and Its Relationship with TNM Staging. *Adv. Biomed. Res.* **2017**, *6* (56).
 - (35) Conrad, U.; Plagmann, I.; Malchow, S.; Sack, M.; Floss, D. M.; Kruglov, A. A.; Nedospasov, S. A.; Rose-John, S.; Scheller, J. ELPylated Anti-Human TNF Therapeutic Single-Domain Antibodies for Prevention of Lethal Septic Shock. *Plant Biotechnol. J.* **2011**, *9* (1), 22–31.
 - (36) Ribeiro, A. Functionality Development in Systems Based on Elastin-like Recombinamers: From Nano-Objects to Macrogels, 2008.
 - (37) Thermo Scientific. NanoDrop One - Guía de Usuario. *NanoDrop One* **2016**, 1–342.
 - (38) Coates, J. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. *Encyclopedia of Analytical Chemistry* 2006.
 - (39) ¿Qué es la espectroscopía infrarroja y FT-IR? ¿Hay alguna diferencia? <https://www.bruker.com/es/products-and-solutions/infrared-and-raman/ft-ir-routine-spectrometer/what-is-ft-ir-spectroscopy.html> (accessed Jun 19, 2021).
 - (40) Malvern; Instruments, M. Dynamic Light Scattering : An Introduction in 30 Minutes. *Tech. Note MRK656-01* **2011**, 1–8.
 - (41) Castillo-Portela, Grolamys; Villar-Delgado, José; Montano-Martínez, Ramón; Martínez, Cristina; Pérez-Alfocea, Francisco; Albacete, Alfonso; Sánchez-Bravo, José; Acosta-Echeverría, M. Cuantificación Por HPLC Del Contenido de Aminoácidos Presentes En El

FITOMAS-E ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar. *Inst. Cuba. Investig. los Deriv. la Caña Azúcar* **2011**.

- (42) Zhang, X.; Wang, S. Voltametric Behavior of Noradrenaline at 2-Mercaptoethanol Self-Assembled Monolayer Modified Gold Electrode and Its Analytical Application. *Sensors* **2003**, 3 (3), 61–68.
- (43) Piña, M. J.; Alex, S. M.; Arias, F. J.; Santos, M.; Rodríguez-Cabello, J. C.; Ramesan, R. M.; Sharma, C. P. Elastin-like Recombinamers with Acquired Functionalities for Gene-Delivery Applications. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2015**, 103 (10), 3166–3178.

9. ABREVIATURAS

Las abreviaturas utilizadas en este trabajo se indican a continuación en orden alfabético:

Abreviatura	Nombre completo	Abreviatura	Nombre completo
A	Absorbancia	[pb]	Pares de bases
Ac	Anticuerpo	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ATP	Adenosín trifosfato	pDa	pDriveAll
BPB	Azul de bromofenol	PMSF	Fluoruro de fenilsulfonilmetano
BSA	Albúmina sérica bovina	PSA	Persulfato amónico
[cfu]	Unidad formadora de colonias	rDNA	Ácido desoxirribonucleico recombinante
[Da]	Dalton	Rf	Factor de retraso
DLS	Dynamic light scattering	RMN	Resonancia magnética nuclear
DMSO	Dimetilsulfóxido	RNA	Oxyribonucleic acid
DNA	Deoxyribonucleic acid	RNAasa	Ácido ribonucleasa
DTT	Ditioltreitol	RNAasa	Ribonucleasa
E. coli	Escherichia coli	[rpm]	Revoluciones por minuto
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	S.O.C.	Super Optimal Broth
ELR	Recombinámero tipo elastina	SAP	Fosfatasa alcalina de camarón
EpCAM	Glicoproteína de adhesión epitelial celular	scFv	Anticuerpo monocatenario de fragmento variable
FastAP	Fosfatasa alcalina termosensible	SDS	Dodecilsulfato sódico
FT-IR	Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier	SPE	Extracción en fase sólida
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia	TAE	Tris-ácido acético-EDTA
Ig	Inmunoglobulina	TB	Terrific Broth
LB	Lysogeny Broth	TEMED	Tetrametiletildiamina
LOQ	Límite de cuantificación	TOF	Analizador de tiempo de vuelo
MALDI	Sistema de desorción/ionización mediante láser asistida por matriz	Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
m/q	Masa/carga	umas	Unidades de masa atómica
P12	Anticuerpo específico de la proteína Tenascina C	(VPGKG)	Pentapéptido VPGKG
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida	(VPGKG)_n	Polipentapéptido VPGKG

Código de representación de las bases nitrogenadas

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

Código de representación de aminoácidos

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

ANEXO I

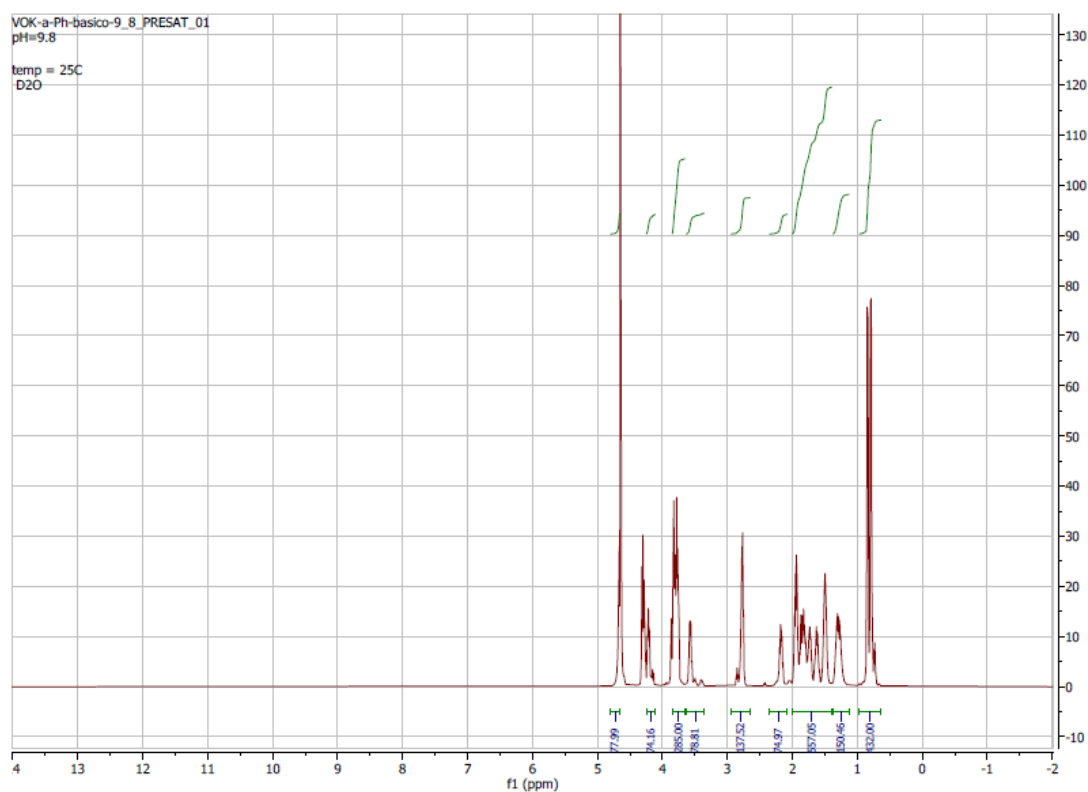


Figura 38. Espectro ^1H -RMN del polímero VOK en espectrómetro de 500Hz. Disolvente usado: D2O. No aparecen señales por encima de 5ppm.

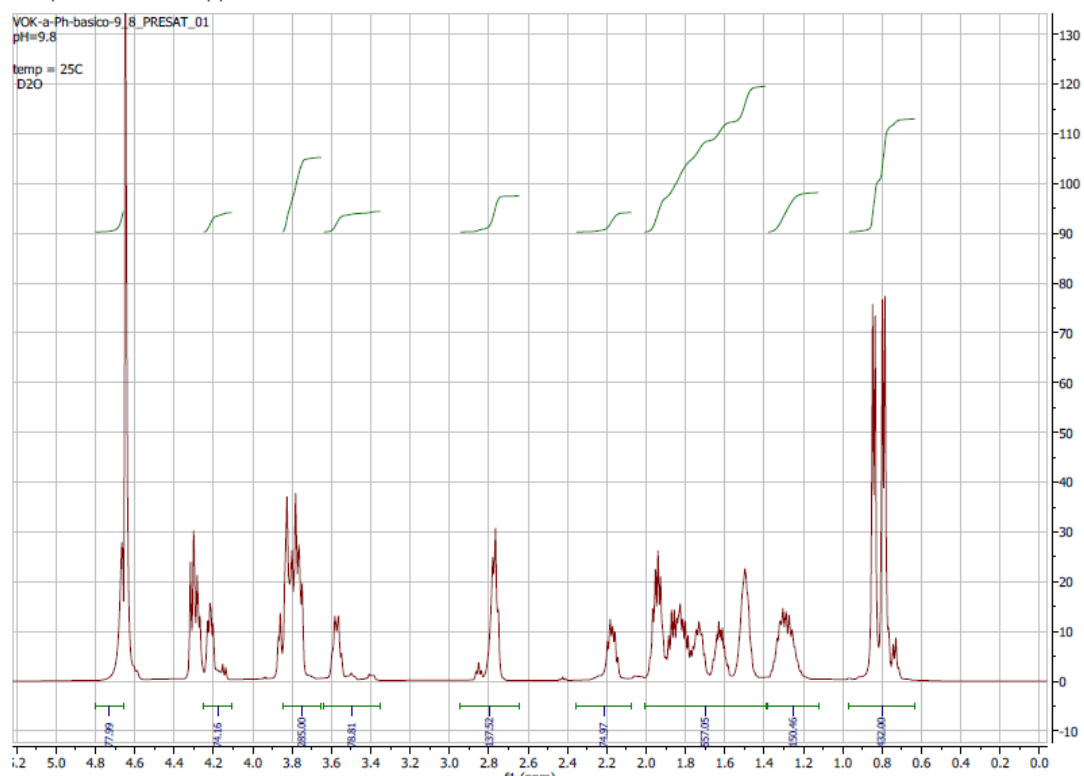


Figura 39. Espectro ^1H -RMN del polímero VOK en espectrómetro de 500Hz. Disolvente usado: D2O. No aparecen señales por encima de 5ppm. (Zoom)

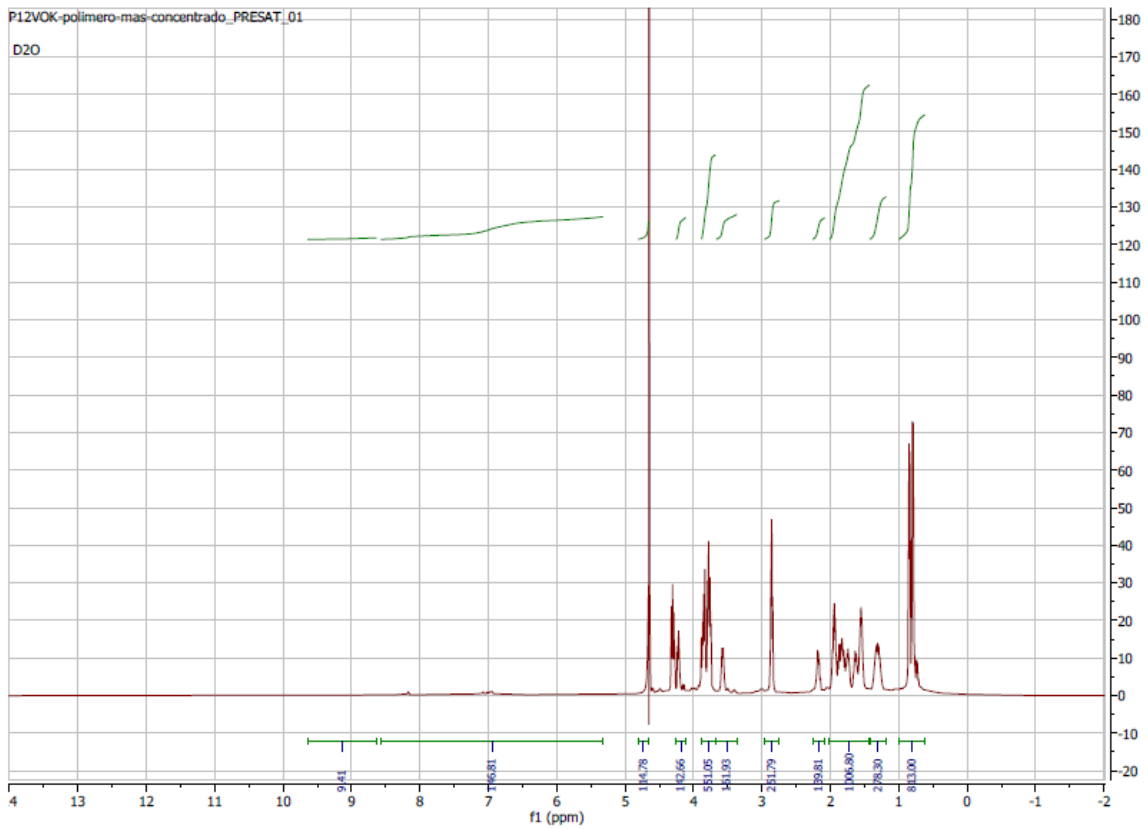


Figura 40. Espectro ^1H -RMN del polímero P12VOKH6 en espectrómetro de 500Hz. Disolvente usado: D2O.

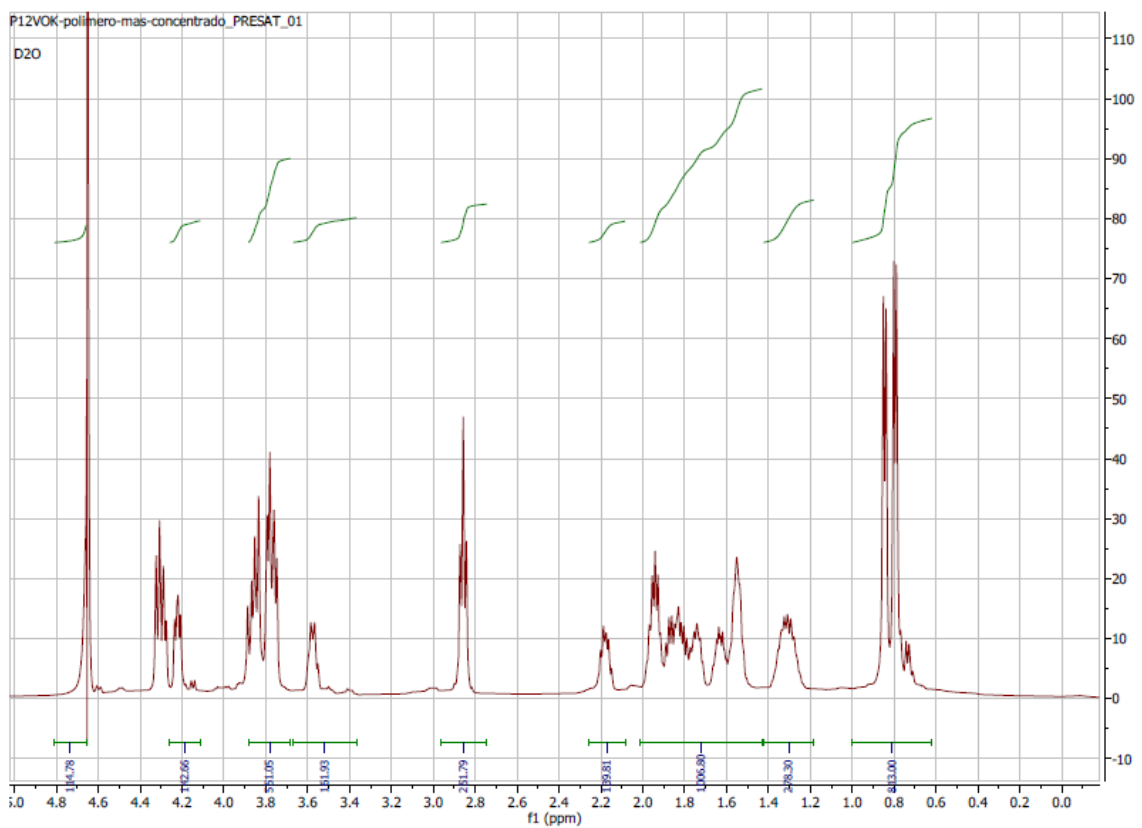


Figura 41. Espectro ^1H -RMN del polímero P12VOKH6 en espectrómetro de 500Hz. Disolvente usado: D2O. (Zoom)