



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

Título del Trabajo

Biosíntesis y caracterización físico-química de polímeros
recombinantes

***Autor:** Andrea Álvarez López*

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

Dra. Raquel Muñoz Martínez

INDICE

1. RESUMEN	6
2. INTRODUCCIÓN	7
1. DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INGENIERIA GENÉTICA Y BIOMATERIALES	7
2. CLONACIÓN DEL DNA	8
2.2.1. Herramientas Enzimáticas de Clonación:	9
3. ELASTINA	10
2.3.1. Polímero tipo elastina (ELP)	11
2.3.2. Polímero recombinante tipo elastina (Elastin Like Recombinamers ELR).....	12
4. BIODISPOSITIVOS AVANZADOS PARA NANOMEDICINA.....	13
2.4.1. Tetrabloque (EI)2.....	14
2.4.2. Anticuerpo scFv	15
3. OBJETIVOS	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
1. MATERIALES	17
4.1.1. Reactivos Químicos	17
4.1.2. Disoluciones Tamponadas.....	17
4.1.3. Materiales de Biología Molecular.....	18
4.1.4. Proteínas.....	19
4.1.5. Vectores Plasmídicos.....	20
4.1.6. Plásmidos empleados para la introducción de insertos.....	21
4.1.6.1. pDA-H6	21
4.1.6.2. pDA-(EI)2-H6.....	21
4.1.7. Kits para la purificación y extracción del DNA.....	22
2. MÉTODOS.....	23
4.2.1. Digestión de DNA mediante enzimas de restricción	23
4.2.2. Defosforilación del DNA	23
4.2.3. Reacción de Ligación	24
4.2.4. Transformación	24
4.2.5. Preparación de placas Petri para cultivo bacteriano.....	26
4.2.7. Purificación de los fragmentos de DNA.....	27
4.2.8. Electroforesis de DNA.....	29
4.2.10. Determinación de la concentración y análisis de la pureza de DNA	33
4.2.11. Secuenciación del DNA.....	34

4.2.12.	Electroforesis de proteínas (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis SDS-PAGE)	35
4.2.13.	Protocolo de Bioproducción de Polímeros Recombinantes.....	36
4.2.14.	Preparación de los distintos cultivos de la colonia seleccionada.....	37
4.2.15.	Procesado de la Biomasa.....	38
4.2.16.	Purificación de polímeros recombinantes tipo elastina.....	39
4.2.17.	Caracterización Físico-Química	40
4.2.17.1.	Espectrometría de masas (MALDI-TOF)	40
4.2.17.2.	Espectroscopía DLS (Dynamic Light Scattering)	41
4.2.17.3.	Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	42
4.2.18.	Caracterización Funcional	43
4.2.18.1.	ELISA	43
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
1.	CONSTRUCCIÓN DEL GEN pET7-scFv(B8)-(EI)2-H6.....	44
5.1.1.	Descripción de la construcción del gen pET-scFv(B8)-(EI)2-H6.....	45
5.1.2.	Síntesis Experimental del gen pET7-scFv(B8)-(EI)2-H6.....	47
5.1.2.1.	Construcción del inserto scFv(B8)-(EI)2 y reacción de ligación con el vector pDA-H6	47
5.1.2.1.1.	Reacción de ligación del plásmido pDA-(EI)2 y el inserto scFv(B8)	47
5.1.2.1.2.	Escisión del inserto scFv(B8)-(EI)2	48
5.1.2.1.3.	Linealización y defosforilización de pDA-H6	48
5.1.2.1.4.	Reacción de ligación del plásmido pDA-H6 y del inserto scFv(B8)-(EI)2 para formar el gen pDA-scFv(B8)-(EI)2-H6	49
5.1.2.1.5.	Escisión del inserto scFv(B8)-(EI)2-H6 del vector de clonación.....	50
5.1.2.2.	Construcción del gen pET7-scFv(B8)-(EI)2-H6	51
5.1.2.2.1.	Reacción de ligación del plásmido pET7 y del inserto scFv(B8)-(EI)2-H6 para generar el gen pET7-scFv(B8)-(EI)2-H6	51
2.	SECUENCIACIÓN DEL PLÁSMIDO pET7-scFv(B8)-(EI)2-H6.....	53
5.2.1.	Descripción de la corrección de la mutación del gen pET7-scFv(B8)-(EI)2-H6.....	53
5.2.2.	Síntesis experimental del plásmido pET7-scFv(B8)-(EI)2-H6 libre de mutación	54
5.2.2.1.	Escisión del inserto scFv(B8)-(EI)2 sin mutar.....	54
5.2.2.2.	Obtención del plásmido pET7- scFv(B8)-(EI)2-H6 sin el fragmento mutado.....	54
5.2.2.3.	Clonación del plásmido pET7-scFv(B8)-(EI)2-H6 libre de mutación	55
3.	BIOPRODUCCIÓN DEL POLÍMERO RECOMBINANTE TIPO ELASTINA (B8)-(EI)2-H6.....	56
4.	PURIFICACIÓN DEL POLÍMERO RECOMBINANTE B8(EI)2H6	59

5.	CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL POLÍMERO B8(EI)2H6:	61
5.5.1.	Espectrometría de masas: MALDI-TOF.....	61
5.5.2.	Espectroscopía DSL.....	62
5.5.3.	Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	64
6.	CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL POLÍMERO B8(EI)2H6.....	66
5.6.1.	ELISA	66
6.	CONCLUSIONES	68
7.	PERSPECTIVAS DE FUTURO.....	69
8.	BIBLIOGRAFÍA	70
9.	ABREVIATURAS.....	73

1. RESUMEN

La elastina, gracias a sus propiedades de autoensamblado, resistencia y elasticidad, es una de las proteínas con mayor importancia e interés en el área de la ciencia de los biomateriales. Gracias al estudio de su estructura se pudo establecer una relación entre esta estructura y sus cualidades fisicoquímicas, esto generó un gran interés por la síntesis de polímeros recombinantes tipo elastina (ELR) obtenidos con ingeniería genética que permite la obtención de ELR de gran complejidad molecular y funcional. Debido a las múltiples propiedades que poseen estos biopolímeros, así como su elevada biocompatibilidad, son objeto de gran interés en el desarrollo de biomateriales avanzados en el área de la Biomedicina.

En este trabajo se emplean técnicas de Ingeniería genética para diseñar un nuevo gen recombinante tipo elastina que codifica para el ELR scFv(B8)-(E1)2-H6, la secuencia de aminoácidos de este biopolímero determina su biofuncionalidad y su autoensamblado en estructura micelar en disolución acuosa. Para su síntesis se emplean distintas cepas de la bacteria *Escherichia Coli* (*E. Coli*) ya que ofrece una sencilla maquinaria de replicación y traducción de DNA. Por último, se lleva a cabo una caracterización Físico-Química: electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), espectrometría de masas (MALDI-TOF), dispersión de luz (DSL), resonancia magnética nuclear (RMN) y ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

ABSTRACT

Elastin, due to its self-assembly, strength and elasticity properties, is one of the most important and interesting proteins in the area of biomaterials science. Thanks to the study of its structure, it was possible to establish a relationship between this structure and its physicochemical qualities, which generated a great interest in the synthesis of recombinant elastin-like polymers (ELR) obtained with genetic engineering that allows obtaining ELRs of great molecular and functional complexity. Due to the multiple properties of these biopolymers, as well as their high biocompatibility, they are of great interest in the development of advanced biomaterials in the field of biomedicine.

In this work, genetic engineering techniques are used to design a new recombinant elastin-like gene encoding for the ELR scFv(B8)-(E1)2-H6, the amino acid sequence of this biopolymer determines its biofunctionality and its self-assembly in a micellar structure in aqueous solution. Different strains of the bacterium *Escherichia Coli* (*E. Coli*) are used for its synthesis, as it offers a simple DNA replication and translation machinery. Finally, a physical-chemical characterization is carried out: polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), mass spectrometry (MALDI-TOF), light scattering (DSL), nuclear magnetic resonance (NMR) and Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA).

2. INTRODUCCIÓN

1. DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INGENIERIA GENÉTICA Y BIOMATERIALES

Los progresos en las distintas disciplinas científicas dependen de la habilidad de las técnicas y métodos que amplían la calidad y sofisticación del experimento. En los últimos 40 años la Biología Molecular ha sufrido una revolución gracias a una serie de técnicas de investigación nueva(1). Una de las técnicas que más repercusión han tenido y en la cual nos centraremos es la Ingeniería Genética(2).

La Bioquímica y la Biología Molecular son las disciplinas científicas cuyo objetivo es el estudio de los procesos celulares desarrollados en los seres vivo desde el punto de vista molecular, así, dan una explicación a los complejos procesos que ocurren en el interior de las células, basándose en la estructura y función de las principales macromoléculas que la componen: ácidos nucleicos, proteínas, glúcidos, entre otros. El dogma central de la Biología Molecular fue propuesto por Francis Crick(3), este propone que el ácido desoxirribonucleico (DNA) almacena y transmite la información genética que posteriormente a partir del proceso de transcripción da lugar al ácido ribonucleico (RNA) y este se traduce permitiendo la síntesis de las proteínas, la más compleja y eficientes maquinas moleculares (Figura 1)

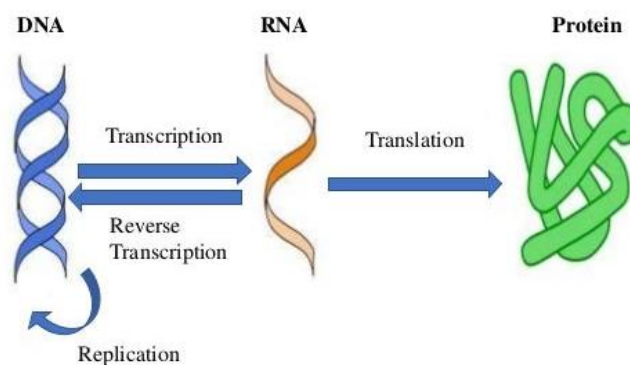


Figura 1: Esquema del dogma central de la Biología Molecular descrito por Francis Crick(3).

La ingeniería genética, conocida también como metodología del DNA recombinante, se basa en el conjunto de métodos y herramientas a partir de los cuales se puede manipular y seleccionar el DNA. Estas metodologías permiten la transferencia y control de material genético del mismo organismo o de un organismo a otro, de este modo, se pueden generar nuevas especies, corregir defectos genéticos e incluso fabricar compuestos (4). La ingeniería genética se sustenta en dos tipos de herramientas, que veremos más adelante en detalle: enzimas que usan la propia célula en sus procesos internos para el control del su material genético y los vehículos moleculares del DNA.

La ingeniería Genética ha supuesto un avance para la investigación básica en la Bioquímica e incluso ha sido de gran relevancia en Farmacología, Ciencias Forenses y en la síntesis de productos avanzados en Biomedicina (5).

Los **Biomateriales** se pueden definir como cualquier sustancia o combinación de sustancias que no sean fármacos, sintéticas o naturales, que pueden ser usadas durante cualquier periodo de tiempo, como un todo o parte de un sistema, que diagnostica, aumenta o reemplaza cualquier tejido, órgano o función del cuerpo(6). Aunque acorde a su definición, se ha encontrado el uso de biomateriales desde el nacimiento de las civilizaciones (prótesis funcionales), el gran desarrollo de esta rama de la ciencia empezó con las Guerras Mundiales. En este periodo, debido a la necesidad de atender al enorme número de lisiados provocados en los conflictos, comenzó el estudio y la selección de materiales más inertes y tolerables. Además, se puso de manifiesto que era necesario incrementar la biocompatibilidad y la especificidad para reemplazar la función u órgano determinado. En las últimas décadas la investigación en el campo se ha centrado en el diseño de nuevos biomateriales basándose en componentes sintéticos y biológicos, los llamados materiales “biomiméticos”, biohíbridos o biofuncionales. Esta última generación de biomateriales son lo que pueden ofrecer las soluciones más avanzadas y prometedoras (7).

2. CLONACIÓN DEL DNA

La clonación del DNA es una técnica de la Ingeniería Genética que consiste en generar copias idénticas (clones) de un segmento génico. Los objetivos de la técnica de clonación del DNA pueden ser: la obtención de más copias de un gen, la producción de grandes cantidades de una proteína o aportar a un organismo una función que no posee (8). En el caso del proyecto de investigación aquí presentado, a partir de la clonación se podrá amplificar el gen, denominado inserto, que codifica para el polímero recombinante tipo elastina de interés.

En la Figura 2 que muestra el proceso de Clonación se pueden diferenciar las siguientes etapas:

1. Identificación del Gen: se identifica o sintetiza el fragmento de DNA que contiene el gen que se va a clonar, para poder realizar una clonación controlada este gen debe ser aislado.
2. Digestión Enzimática, Modificación y Purificación: en esta etapa se obtiene el gen aislado del cromosoma.
3. Ligación: unión del gen extraído a un sistema vectorial. En este paso se emplea un vector de clonación que es un plásmido. Los plásmidos son moléculas de DNA de doble hebra y tamaño pequeño que se aíslan, manipulan y caracterizan fácilmente, se conoce su secuencia y mapa de restricción y se pueden introducir fácilmente en la célula huésped

dónde se autorreplican independientemente del DNA de esa célula. De este modo el inserto se introduce en el plásmido obteniéndose la molécula de DNA recombinante.

4. Transformación: Proceso por el que el plásmido con el gen de interés se introduce en una célula huésped. En este paso se produce la amplificación del fragmento génico, lo que permite obtener muchas copias idénticas de este.

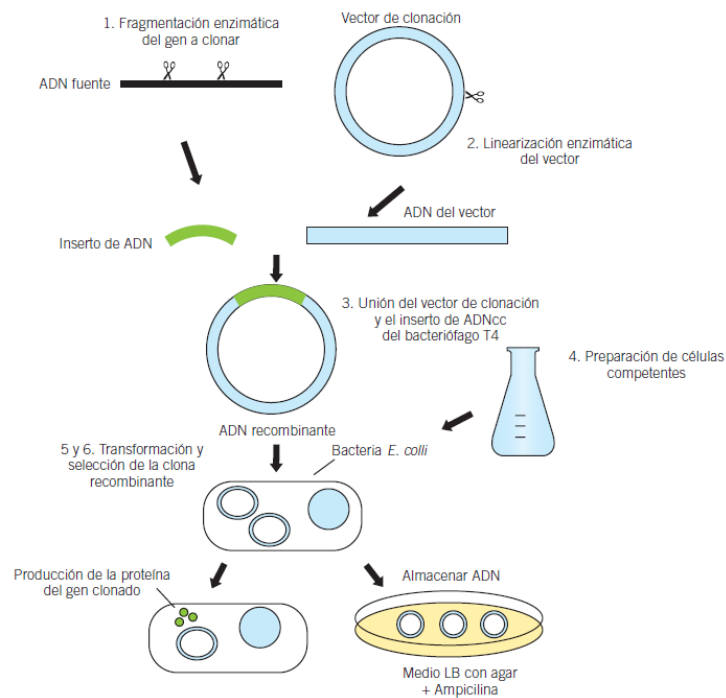


Figura 2: Descripción del proceso de clonación del DNA (31)

Una vez se finaliza la clonación y se comprueba que el clonaje ha sido correcto, se realiza una segunda clonación en este caso con un vector de expresión, este es otro tipo de vector plasmídico que maximiza la producción del polímero de DNA recombinante que lleva a cabo la célula huésped. Así, se lleva a cabo una segunda **transformación**.

En el proceso de la transformación, es muy importante seleccionar la célula huésped más adecuada. De este modo, podemos utilizar, bacterias, células de insecto, células de mamífero in vitro, *etc.* En nuestro caso se llevarán a cabo transformaciones bacterianas, ya que las bacterias son fáciles de obtener, multiplicar y hay un gran conocimiento de la secuencia reguladora de la expresión génica (8)

2.2.1. Herramientas Enzimáticas de Clonación:

Entre las enzimas empleadas en la clonación encontramos las denominadas endonucleasas, proteínas con actividades biológicas que rompen uniones covalentes fosfodiéster en las hebras de DNA y de RNA. Dentro de esta clase de enzimas encontramos las enzimas endonucleasas de restricción (8), estas últimas son capaces de identificar pequeñas secuencias específicas de nucleótidos en el DNA y pueden

hidrolizar o cortar moléculas circulares de DNA. De este modo usando la misma enzima de restricción se puede digerir, siempre del mismo modo, un DNA concreto.

La ingeniería Genética emplea mucho como herramienta enzimática las endonucleasas de tipo II, que reconocen una secuencia palindrómica determinada, normalmente de 4 o 6 nucleótidos y siempre cortan en el mismo lugar de la secuencia reconocida que se denomina secuencia diana. Estas enzimas pueden cortar las cadenas generando extremos romos o extremos cohesivos, los romos cortan en el centro del palíndromo de tal forma que no dejan bases desapareadas, sin embargo, los cohesivos dejan de dos a cuatro bases desapareadas en los extremos (Figura 3).

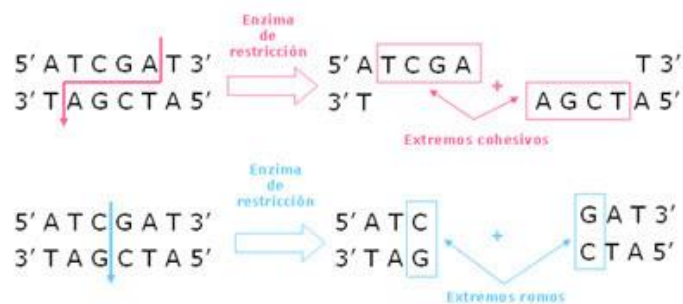


Figura 3: esquema de corte con enzimas que generan extremos romos o extremos cohesivos.

La nomenclatura de estas endonucleasas de restricción se basa en la abreviatura de tres letras, del nombre del organismo de la que se aíslan, seguidas de un número romano. La primera letra hace referencia al género y las dos siguientes a la especie, en ocasiones estas siglas van seguidas de la designación particular de la cepa. Por último, el número romano señala el orden de descubrimiento de las enzimas según la cepa. Así, por ejemplo, la enzima *EcoRI* resulta de *E. coli* organismo del que se aísla, R del factor de resistencia y el número romano I indica que es la primera enzima descubierta para esta cepa.

Dentro de este tipo de enzimas podemos encontrar otro subtipo, las **endonucleasas IIS**, que en cambio identifican secuencias asimétricas o degeneradas. Además, este subtipo difiere también por digerir posiciones muy definidas fuera de la secuencia diana.

Además de las enzimas de restricción, en ingeniería genética se emplean enzimas de modificaciones como las ligasas, estas son enzimas que realizan la función contraria a las nucleasas, es decir, forman uniones covalentes fosfodiéster entre diferentes fragmentos de DNA, permitiendo la unión del vector plasmídico y el inserto (8).

3. ELASTINA

La Elastina según la Real Academia Nacional de Medicina de España se define como “Proteína que constituye el componente amorfo de la fibra elástica. Los fibroblastos, los condroblastos y las células

musculares lisas segregan tropoelastina, que es la molécula precursora de la elastina” (9). La elastina es uno de los componentes más importantes de la matriz extracelular de los vertebrados. Las primeras investigaciones sobre la elastina apuntaron que era una proteína cuya única función era aportar propiedades mecánicas: elasticidad, resistencia a la fatiga, durabilidad, etc. a los órganos y tejidos (10). Sin embargo, estudios más recientes han demostrado que desempeñan también diferentes funciones (11). Así, se ha visto que tiene relevancia en la modulación del comportamiento de las células y en la reparación tisular, un complejo proceso de reparación de lesiones que incluye distintas etapas como la inflamación, división celular, síntesis de las proteínas de la matriz celular, entre otras (12).

En la estructura primaria del precursor de la elastina, la tropoelastina, se encuentran numerosos dominios de entrecruzamiento y elastoméricos. La secuencia de aminoácidos de los dominios elastoméricos está formada principalmente por aminoácidos hidrofóbicos, destacando la repetición de hasta más de cincuenta veces del siguiente pentapéptido: Valina-Prolina-Glicina-Valina-Glicina, VPGVG. De tal forma que cuando la proteína se secreta al exterior celular se autoensambla formando agregados que evitan la interacción con el agua, se vuelve insoluble, estos agregados dan lugar a la estructura cuaternaria de la elastina que es la responsable de su principal propiedad, la elasticidad (13). Así, la elastina es una proteína cuya estructura permite que se deforme sin romperse y, una vez se deja de aplicar la fuerza que la deforma recupera su conformación original (13).

2.3.1. Polímero tipo elastina (ELP)

Los Polímeros tipo elastina o ELPs (Elastin Like Polymers) son polipéptidos artificiales basados en la secuencia repetitiva de la elastina. En base a los resultados obtenidos de una investigación que se centraba en el estudio de un polímero $(VPGXG)_n$, donde n representa el número de repeticiones del pentapéptido y siendo $n \leq 150$, se llegó a la conclusión de que estas secuencias eran las responsables de la elasticidad de la elastina, de este modo, estos polímeros se denominaron polímeros tipo elastina (14). Los polímeros más comunes se basan en la repetición del motivo $(VPGXG)_n$, donde X puede ser cualquier aminoácido, menos Prolina ya que se ha demostrado que impide el correcto plegamiento de la estructura secundaria, de tal modo, que no se puede llegar a la estructura cuaternaria y con ello se pierden las propiedades de interés (15).

Si se analizan sus propiedades se puede ver como la mayoría de sus características derivan de la proteína natural en la que se basan, la elastina. Por ejemplo, la matriz de estos polímeros conserva la mayoría de sus propiedades mecánicas, es decir, presentan una gran elasticidad y resistencia a la fatiga. Además, los ELP presentan una extraordinaria biocompatibilidad, ya que, el sistema inmunitario no es capaz de diferenciar la elastina de un ELP gracias al gran parecido de las secuencias.

Otras características, muy importantes, que caracterizan a estos polímeros son su naturaleza termoestable y el comportamiento de autoensamblable. Estas propiedades se basan en la transición molecular del polímero en disolución cuando la temperatura a la que se encuentra supera cierto rango. Esta transición se conoce como temperatura de transición inversa (ITT) y ha sido clave en el desarrollo de nuevos polímeros basados en péptidos. Todos los ELP funcionales exhiben este comportamiento de fase reversible. En disolución acuosa y por debajo de la Temperatura de Transición (T_t), las cadenas libres del polímero están desordenadas, y el polímero se encuentra disuelto gracias a que sus residuos apolares están rodeados de estructuras de agua tipo clatrato. Sin embargo, cuando se supera esta temperatura el agua que rodea los residuos apolares pierde su orden por la agitación térmica y así, la cadena hidrofóbica se pliega adoptando una estructura llamada espiral β , constituida por una sucesión de horquillas β . La Temperatura de transición depende de factores extrínsecos como del número de veces que se repite la secuencia $(VPGXG)_n$, es decir del n , y de la naturaleza del residuo X de este motivo repetitivo. Por otro lado, factores extrínsecos como el pH, la presión, fuerza iónica y las modificaciones covalentes también pueden afectar a la T_t (16).

Los ELP fueron diseñados por el grupo de investigación de D. W. Urry (16) empleando métodos químicos convencionales, siendo el de mayor importancia la síntesis en fase sólida de Merrifield. Esta síntesis presentaba algunos inconvenientes como la toxicidad y coste de los reactivos o limitaba la longitud del polímero utilizable. Este último problema se daba porque al aumentar la longitud del polipéptido, disminuía la capacidad de acoplamiento entre los péptidos dando lugar a una gran cantidad de subproductos y por consiguiente una baja pureza. Además, este procedimiento químico necesitaba obligatoriamente el uso de disolventes orgánicos y su posterior eliminación en la purificación (8).

Debido al gran número de inconvenientes que tenía la síntesis de ELP por métodos convencionales, los investigadores se vieron obligados a buscar otra opción para sintetizarlos. El empleo de las técnicas de ingeniería genética, es decir, usar la tecnología de DNA recombinante para poder obtener nuevos ELPs constituyó la creación de los Polímeros Recombinantes tipo elastina (15).

2.3.2. Polímero recombinante tipo elastina (Elastin Like Recombinamers ELR)

Los ELP que se producen biosintéticamente se denominan ELR. Este tipo de macromoléculas tiene una composición idéntica a los ELP diferenciándose en el modo de síntesis y por lo tanto poseen sus propiedades (17).

Para sintetizar los genes codificantes de los ELR se emplea la clonación *seamless* o “sin costuras” (18) (Figura 4). Esta se basa en el uso de las endonucleasas de restricción Tipo IIS descritas en el apartado 2.2.1, que permiten tener un control absoluto de la secuencia final. El proceso de síntesis se realiza mediante ciclos repetidos de clonación de genes recombinantes lo que permite obtener múltiples copias de los mismos, seguido de la transcripción y traducción, lo cual da lugar a la secuencia de aminoácidos del polipéptido. Gracias a este proceso de síntesis se consiguen biopolímeros más puros y se trata de un proceso de síntesis respetuoso con el medio ambiente, ya que su purificación se basa en trabajar con la temperatura de transición, se realizan ciclos de enfriamiento-calentamiento, evitando emplear disolventes orgánicos para la extracción.

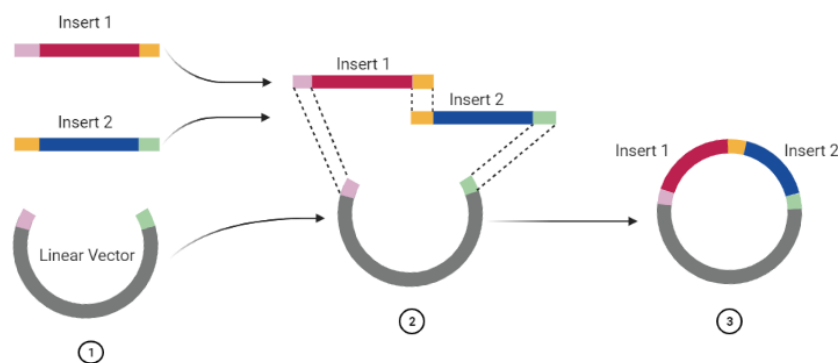


Figura 4: Proceso de clonación *Seamless* o "sin costuras"

El recombinámero ELR descrito en este trabajo se ha diseñado con el fin biomédico de actuar como andamios avanzados para la ingeniería de tejidos y como dispositivo de administración de fármacos autoensamblados.

4. BIODISPOSITIVOS AVANZADOS PARA NANOMEDICINA

Muchas enfermedades se originan por alteraciones en los procesos biológicos a nivel molecular: genes mutados, proteínas mal plegadas, infecciones causadas por virus o bacterias, *etc.* Todas estas alteraciones pueden provocar un mal funcionamiento celular, y enfermedades potencialmente mortales. En la actualidad el tratamiento de estas enfermedades es posible gracias a la nanomedicina.

La nanomedicina se define como “diseño controlado, caracterización, producción y aplicación de materiales, estructuras, dispositivos y sistema mediante el control de su tamaño y forma en el rango de nanoescala (1 a 100 nm)”(19).

Los procesos que implican el autoensamblaje de los polímeros, incluido proteínas, son actualmente objeto de mucha atención debido a los grandes avances que ofrecen, como la creación de modelos para el estudio del plegamiento de proteínas o de enfermedades causadas por el plegamiento erróneo de estas mismas, entre este tipo de moléculas encontramos los polímeros tipo elastina que

estudiaremos a lo largo de este trabajo(20). Una de las aplicaciones de los biomateriales basados en la elastina es su uso para formar nanocapsulas, que sirven como sistemas de administración de fármacos. Este tipo de cápsulas ofrece una serie de ventajas frente a los vehículos convencionales. Las presentaciones de fármacos empleadas habitualmente sufren una disminución de su eficacia debido al proceso de detoxificación de los seres vivos (cuando estas moléculas se encuentran en el torrente sanguíneo, el sistema excretor es capaz de eliminarlas en cuestión de minutos). Así, para una administración más eficaz de los fármacos se están desarrollando vehículos que sean capaces de aumentar la solubilidad en la sangre y su especificidad permitiendo que estas moléculas sean absorbidas y metabolizadas en los órganos diana. En este sentido los ELP con una secuencia de aminoácidos hecha a medida para una aplicación biomédica específica pueden maximizar la eficacia en la encapsulación de fármacos. (21).

2.4.1. Tetrabloque (EI)²

Los recombinámeros se conocen como copolímeros tipo elastina de bloques, la polaridad de cada uno de estos bloques varía en función de la influencia del cuarto aminoácido (X) del pentapéptido VPGXG, así el bloque puede ser hidrofóbico o hidrofílico.

El tetrabloque con el que se trabaja en este caso, conocido como (EI)² presenta una doble polaridad lo que permite crear micelas. Este dibloque es anfifílico, presenta un bloque hidrofóbico que forma el core o interior de la micela, en este caso está formado por la Isoleucina (I), y otro bloque hidrofílico compuesto por el ácido glutámico (E) y que se sitúa en el exterior o corona de la micela (Figura 5). La estabilidad de este tipo de partículas depende del tamaño molecular del recombinámero que la forma, así, se establece que un ELR micelar es estable siempre que esté constituido por un mínimo de 48 pentapéptidos(22).

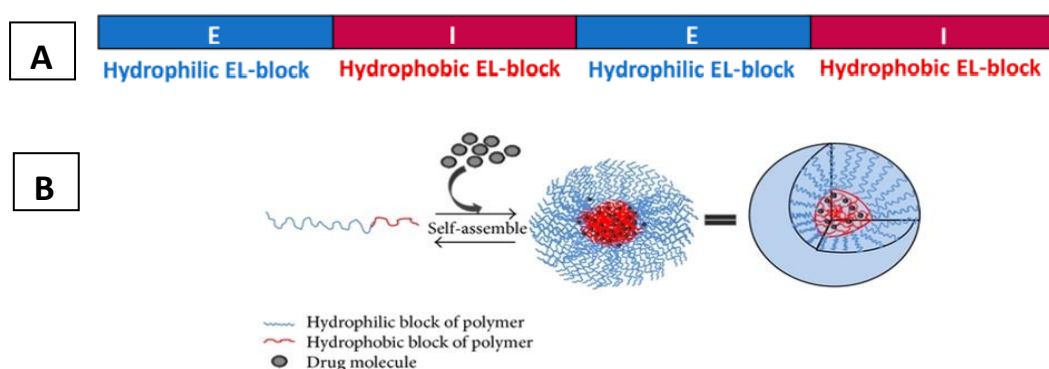


Figura 5: Panel A: Esquema de la estructura del tetrabloque (EI)². En azul se muestra el bloque hidrofílico de ácido glutámico (E) y en rojo el bloque hidrofóbico e isoleucina (I). Panel B: Esquema de la formación de la micela a partir del tetrabloque (EI)²

Gracias a la naturaleza hidrofóbica del interior de la micela se producen interacciones hidrofóbicas con el fármaco que evitan el contacto con el agua. Por otro lado, la corona hidrofílica protege al medicamento de los procesos de detoxificación de los seres vivos. Estudios realizados por el grupo de investigación de Chilkoti comprobaron que el medicamento con encapsulación micelar puede permanecer hasta 10 horas en el organismo frente a los pocos minutos que permanece sin encapsular (23).

2.4.2. Anticuerpo scFv

Un anticuerpo se define como “proteína producida por el sistema inmunitario del cuerpo cuando detecta sustancias dañinas llamadas antígenos” (24) . Estos están constituidos por cuatro cadenas polipeptídicas que se mantienen unidas gracias a puentes disulfuro y uniones no covalentes. Dentro de estas cuatro cadenas se puede diferenciar dos cadenas ligeras idénticas entre sí y dos cadenas pesadas también idénticas entre sí. La molécula de anticuerpo es modular y sus dominios se pueden extraer para fines biomédicos y genéticos. Así, se encuentran los denominados scFv (single chain variable fragment), son moléculas recombinantes en las que las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas de las inmunoglobulinas que codifican los dominios de unión a antígeno se unen dando lugar a un único polipéptido (Figura 6) (25).

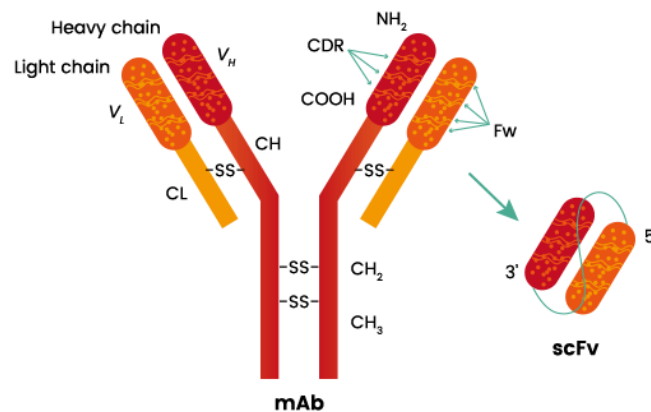


Figura 6: Representación esquemática de un anticuerpo (izquierda) y su scFv (derecha)

Este tipo de fragmentos, scFv, se pueden sintetizar fácilmente, de manera rápida y controlada gracias a las técnicas de ingeniería genética, que permiten expresar una forma funcional en bacterias de tipo *E. Coli*. Esto permite mejorar las propiedades de los scFv y aumentar su afinidad (26).

3. OBJETIVOS

El **objetivo general** del presente trabajo es sintetizar el gen scFv(B8)-(E1)2-H6, subclonarlo en un plásmido de expresión “pET7” y la posterior bioproducción del polímero recombinante (ELR) al que codifica (scFv(B8)-(E1)2-H6), el cual está compuesto por la fusión de un tetrabloque (E1)x2 (2.4.1), que presenta alternancia de naturaleza hidrofílica e hidrofóbica, y un anticuerpo scFv (2.4.2) dirigido al factor de crecimiento VEGF de células endoteliales, junto con una cola de 6 histidinas. Esta composición le otorga una doble función, ya que en disolución acuosa puede formar micelas huecas cuya superficie está recubierta con anticuerpos scFv. De este modo, este ELR se podrá aplicar en la encapsulación de fármacos hidrofóbicos, dirigiéndolos hasta las células endoteliales vasculares de los pacientes donde se liberan.

Para desarrollar la síntesis del gen scFv(B8)-(E1)2-H6, su subclonación y la bioproducción del polímero recombinante (ELR) scFv(B8)-(E1)2-H6 se plantean los siguientes **objetivos específicos**:

1. Emplear técnicas de Ingeniería genética para sintetizar el gen -scFv(B8)-(E1)2-H6 que pueda expresar el ELR scFv(B8)-(E1)2-H6.
2. Producir el ELR scFv(B8)-(E1)2-H6 a gran escala y purificarlo mediante cromatografía en fase sólida en columna de afinidad.
3. Realizar una caracterización físico-química del ELR scFv(B8)-(E1)2-H6 empleando diferentes técnicas: electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), espectrometría de masas (MALDI-TOF), dispersión dinámica de la luz (DLS), resonancia magnética nuclear (RMN) y ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

4.1.1. Reactivos Químicos

-Acetato de Magnesio	-Dimetilsulfóxido, DMSO	-Isopropanol
-Acetato de Potasio	-Ditioltreitol, DTT	-Kanamicina
-Ácido clorhídrico, HCl	-Dodecilsulfato sódico, SDS	-Marker de Proteínas, NZY-Bluesafe®
-Ácido acético	-DNA Marker, NZYDNA Ladder III	-Persulfato amónico, PSA
-Ácido etilendiaminotetraacético, EDTA	-Etanol	-Poliacrilamida
-Albumina sérica bovina, BSA	-Extracto de levadura	-SimplySafe™
-ATP	-Fluoruro de Fenilsulfonilmetano, PMSF	-SeaKem LE Agarosa
-Azul de Bromofenol	-Glucosa	-Sulfato de Magnesio, $MgSO_4$
-Azul de Coomassie	-Glicerol	-Tetrametilendiamina, TEMED
-Ampicilina	-Hidróxido Sódico, NaOH	Tris(hidroximetil)aminometano, Tris
-Butanol	-Isopropil- β -D-1-tigalactopiranosido, IPTG	-Tris-acetato
-Cloruro de Potasio, KCl		-Tris HCl
-Cloruro de Magnesio, $MgCl_2$		- β -mercaptoetanol
-Cloruro de Sodio, NaCl		
-Cloruro de Cobre (II), $CuCl_2$		

4.1.2. Disoluciones Tamponadas

Gracias a las disoluciones tamponadas el pH de las soluciones se conoce en todo momento, es constante y preciso. En la siguiente lista se pueden observar las disoluciones tamponadas (Buffers) empleadas, así como su composición y pH al que mantienen la solución:

- **Tampón Tango 10x** (Thermofisher) (pH 7.9): 66 mM acetato de potasio, 33 mM Tris-acetato, 10 mM acetato de magnesio, 0,1mg/mL albúmina sérica bovina (BSA).
- **Tampón Sap 10x** (Thermofisher) (pH 9.0): 50 mM Tris-HCl, 10mM $MgCl_2$.
- **Tampón FastDigest Green 10x** (Thermofisher) (pH 8.0).
- **Tampón DNA Ligasa 10x** (Thermofisher) (pH 7.8): 300mM Tris HCl, 10 mM DTT, 100mM $MgCl_2$, 1 mM ATP.
- **Tampón TAE 50x** (pH 7.5): 40 mM Tris, 19 mM ácido acético, 1mM EDTA.
- **Tampón de carga de DNA** (pH 6,5): 312, 5 mM Tris, 10% SDS, 50% Glicerol, 25& 2-ME, 0,00625% Azul de Bromofenol.
- **Tampón Fosfato Salino, PBS** (pH 7.4): 173 mM NaCl, 10mM Na_2HPO_4 , 2.7mM KCl, 1.8 mM KH_2PO_4 .

- **Tampón de carga SDS-PAGE 5x** (pH 6.8): 50% glicerol (v/V), 25%(v/V) β-mercaptoetanol, 10% (m/V) SDS, 2%(v/V) azul de bromofenol (BPB), 0.3M Tris.
- **Tampón de electroforesis 5x** (pH 8.3): 0,96M Glicina, 0,12M Tris base, 0,02M SDS (esta disolución se preparada por separado y se añade una vez el pH esté ajustado).
- **Tampón de sonicación** (pH 8.0) 20 mM Tris-base, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF.
- **Buffer de lavado de bacterias** (pH 8.0): Tris-base 20 mM, NaCl 140 mM.
- **Buffer de lisis o de sonicado** (pH 8.0): Tris-base 20 mM, EDTA 1mM, PMSF 1mM.
- **Buffer de equilibrado** (Columna Thermo Scientific HisPur™ Ni-NTA Resin) (pH 7.0): guanidina-HCl 3M, imidazol 10 mM, en PBS.
- **Buffer de lavado en gradiente 1** (Columna Thermo Scientific HisPur™ Ni-NTA Resin) (pH 7.4): guanidina-HCl 3M, imidazol 25 mM, 10 mM DTT en PBS.
- **Buffer de lavado en gradiente 2** (Columna Thermo Scientific HisPur™ Ni-NTA Resin) (pH 7.4): imidazol 25 mM, en PBS.
- **Buffer de elución** (Columna Thermo Scientific HisPur™ Ni-NTA Resin) (pH 7.4): imidazol 250 mM, en PBS.

4.1.3. Materiales de Biología Molecular

4.1.3.1. Medios de Cultivo Bacteriano:

- **LB (*Lysogeny Broth*)**: Composición: 10g/L de bactotripton, 5g/L de extracto de levadura y 10g/L de NaCl.
- **LB-agar**: Medio Sólido con el que se recubren las placas de cultivo bacteriano. Se prepara con: 25g/L de del medio LB descrito en el anterior punto y 15g/L de bacto-agar.
- **TB (*Terrific Broth*)**: Composición: 24g/L de extracto de levadura, 20g/L de triptófano, 4mL/L de glicerol, 0,0072M de K_2HPO_4 y 0,017M de KH_2PO_4 .
- **S.O.C Medium Fisher**: Composición: 0,5% (m/V) de extracto de levadura, 2% (m/V) de triptófano, 10mM NaCl, 10mM $MgCl_2$, 10mM $MgSO_4$ y 20mM de glucosa; pH 7.0.
- **Ampicilina 1000x** 100 mg/mL en MilliQ.
- **Kanamicina 1000x** 30 mg/mL en MilliQ.

Una vez preparados los medios de cultivo, es importante esterilizarlos durante 15 minutos con un ciclo de autoclave en un ambiente húmedo a 121°C y 1atm.

4.1.3.2. Cepas bacterianas de *E. coli*

- **NZY5 α Competents Cells** (Nzytech; eficiencia cfu/ μg de plásmido DNA $\geq 10^9$): estas cepas se emplean para la etapa de la ligación del DNA en la clonación. El término cfu se emplea en microbiología para hacer referencia a la unidad formadora de colonias.
- **BLR (DE3) Competents Cells** (Novagen, eficiencia cfu/ μg de plásmido DNA $\geq 10^7$): estas se usan para expresar los polímeros recombinantes o proteínas.

4.1.4. Proteínas

4.1.4.1. Endonucleasas de Restricción:

Las enzimas de restricción son proteínas que degradan ácidos nucleicos hidrolizando enlaces fosfodiéster en ambas hebras del DNA y generando los fragmentos de restricción. Como se mencionó en el apartado 2.2.1 en este trabajo se emplean enzimas de restricción de tipo II y del subtipo IIS.

En la Tabla 1 se recogen las enzimas empleadas en este trabajo:

Tabla 1: Enzimas de restricción. Se detalla su clasificación y su secuencia diana y las extremidades que generan.

DIGESTIÓN PREPARATIVA		DIGESTIÓN ANALITICA	
ENZIMA	SECUENCIA DIANA	ENZIMA	SECUENCIA DIANA
Ear I	5' CTCTTCN NNN 3' 3' GAGAAGNNN 5'	Eco RI	5' GAATTC 3' 3' CTTAAG 5'
Sap I	5' GCTCTTCN NNN 3' 3' CGAGAAGNNNN 5'	Ear I	5' CTCTTCN NNN 3' 3' GAGAAGNNNN 5'
Bam HI	5' G GATCC 3' 3' CCTAGG 5'	Xba I	5' TCTAGA 3' 3' AGATCT 5'
Xba I	5' TCTAGA 3' 3' AGATCT 5'	Hind III	5' AAGCTT 3' 3' TTCGAA 5'

Es importante tener en cuenta que las enzimas empleadas en las digestiones analíticas son del tipo FastDigest, este tipo de enzimas realizan una digestión rápida y completa de DNA, aunque menos fiable.

4.1.4.2. Otras Enzimas:

Además de las endonucleasas de restricción se emplean otras enzimas como:

- **FastTAP:** (Thermosensitive Alkaline Phosphatase) es una enzima fosfatasa alcalina que se encarga de defosforilar los extremos del DNA, es decir, elimina los grupos fosfatos de los extremos 5' y 3'.
- **rSAP** (Shrimp Alkaline Phosphatase): enzima hidrolasa que permite la defosforilación.
- **T4 DNA LIGASA:** enzima con actividad ligasa que cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 5' y 3' del DNA.

4.1.5. Vectores Plasmídicos

Como se ha visto en el apartado 2.2 se trabaja con dos tipos de vectores: vectores de clonación y vectores de expresión.

4.1.5.1. Vector de Clonación:

El vector de clonación empleado en este trabajo es pDriveALL (pDA), este se muestra en la Figura 7, se obtuvo a partir del vector de clonación pDrive de Qiagen por modificación del Dr. A. Ribeiro (27) en el grupo de Materiales Avanzados y Nanobiotecnología BIOFORGE.

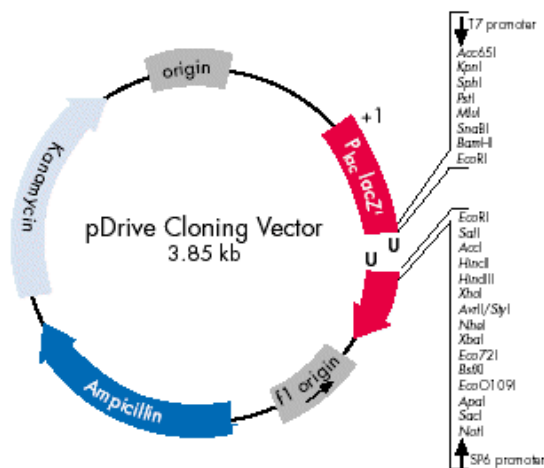


Figura 7: Diagrama esquemático del vector de clonación pDriveAll modificado. (27)

4.1.5.2. Vector de Expresión:

En este trabajo el vector de expresión que se emplea se conoce como pET7, este fue modificado a partir del vector pET-25b por la Dra. A. Girotti (28) en el grupo de Materiales Avanzados y Nanobioteconología BIOFORGE.

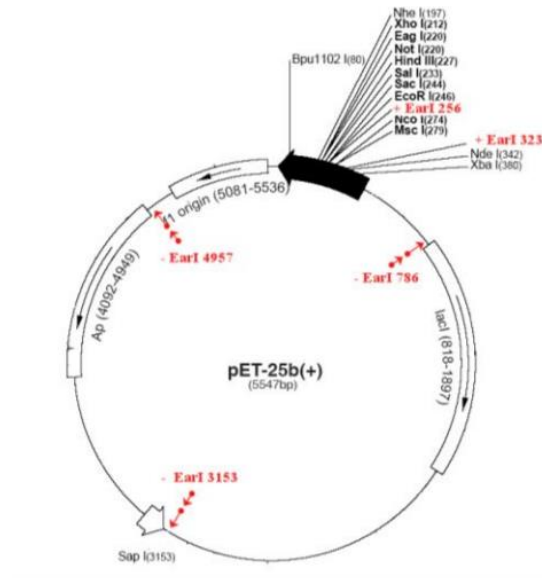


Figura 8: Representación del vector de expresión pET7 modificado a partir del vector pET-25b(+). Las zonas marcadas en rojo corresponden a las modificaciones realizadas. (28)

4.1.6. Plásmidos empleados para la introducción de insertos

Para la síntesis del polímero recombinante tipo elastina de este trabajo se emplean dos plásmidos que contienen fragmentos de DNA que constituyen el gen de dicho polímero.

4.1.6.1. pDA-H6

Este plásmido está constituido por el vector de clonación pDriveAll (Figura 7) y un bloque de 56 pb que codifica para seis histidinas (H) en la cadena polipeptídica. Atendiendo a esto, el plásmido completo pDA-H6 está formado por 3907 pb.

4.1.6.2. pDA-(EI)2-H6

En este caso el plásmido está constituido por los mismos fragmentos descritos para el plásmido pDA-H6; el vector de clonación pDriveAll, el gen que codifica para seis Histidinas, entre los cuales, se encuentra otro fragmento génico que codifica para un tetrabloque compuesto por dos bloques proteicos, nombrados E (hidrofílicos) e I (hidrofóbicos) (Figura 5 (panel A) y Figura 9). Este inserto génico también se denomina tetrabloque y está constituido por 3247 pb. Como se puede ver en la cada uno de estos bloques está formado por repeticiones de secuencias específicas (Figura 9).

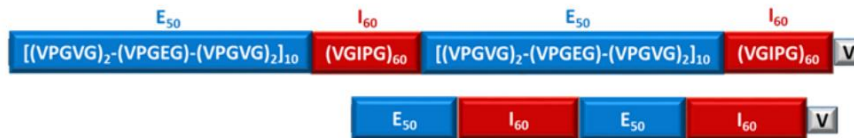


Figura 9: Representación de la secuencia de aminoácidos específica de cada bloque proteico.

El nombre que recibe cada uno de estos bloques está definido por el aminoácido que determina sus propiedades específicas. De este modo, el primer bloque se denomina E ya que se sustituye la Valina (V) por el ácido glutámico (E). El segundo bloque se denomina I ya que se cambia la valina (V) por la isoleucina (I).

Dado que el vector de expresión estaba formado por 3851 pb, el gen que codifica para las 6 histidinas por 56 pb y el gen que codifica para el tetrabloque (EI)2 por 3247 pb, el plásmido completo pDA-(EI)2-H6 está formado por 7154 pb.

4.1.7. Kits para la purificación y extracción del DNA

Es muy importante trabajar en todo momento con fragmentos de DNA puros que permitan obtener las secuencias de aminoácidos correctas de los polímeros. Así, se encuentran una serie de Kits, con protocolos previamente optimizados por la casa comercial, que se aseguran de que estos fragmentos sean purificados a partir de una serie de protocolos. En función del Kit se podrá purificar el fragmento de DNA a partir del cultivo bacteriano o de los geles de agarosa:

- **NucleoSpin® Plasmid/Plasmid Nolid** (macherey-Nagel): Este Kit permite la purificación del DNA plasmídico del cultivo bacteriano de *E. coli* (5mL). En el apartado 4.2.9 se describe el protocolo optimizado de purificación.
- **PureLink Quick Gel Extraction Kit** (Invitrogen, Life Technologies): Este Kit permite la purificación del DNA a partir del gel de Agarosa. La técnica en la que se basa se detalla en el apartado 4.2.7.1.1
- **Quantum Prep Plasmid MidiPrep Kit** (Bio-Rad): Con este Kit se puede obtener el DNA purificado a partir de cultivos bacterianos mayores (40 mL). En este caso la técnica en la que se basa se encuentra en el apartado 4.2.7.1.2

2. MÉTODOS

4.2.1. Digestión de DNA mediante enzimas de restricción

Como ya se vio en el apartado 2.2.1 en este caso se trabaja con enzimas de restricción de tipo II, estas tienen actividad endonucleasa, es decir, reconocen una secuencia diana y la cortan de forma específica, este proceso se conoce como **digestión**.

En el apartado 4.1.4.1 se mencionaron las enzimas empleadas para realizar este trabajo, además, en función del objetivo con el que se lleva a cabo la digestión, podemos diferenciar dos tipos:

- Digestiones Analíticas: en este caso las enzimas empleadas permiten realizar un análisis cualitativo para comprobar si un proceso, como puede ser la clonación, ha ocurrido correctamente.

Para llevar a cabo este tipo de digestión se mezclan en un tubo, 200-1000 ng del plásmido a digerir, con el tampón *Green Buffer Fast Digest* y la cantidad de enzima indicada según la casa comercial y agua ultrapura (MilliQ) hasta completar el volumen necesario para la digestión. Esta mezcla se incuba a 37°C durante 30 minutos en la incubadora estática.

- Digestiones Preparativas: estas digestiones permiten obtener fragmentos específicos de DNA (insertos o plásmidos) para llevar a cabo sus posteriores purificaciones, pudiendo emplearse estos fragmentos purificados en los siguientes procesos de clonación. En estas digestiones preparativas se digieren 4000 ng del plásmido de interés con la cantidad adecuada de enzima que especifica la casa comercial, tampón Tango Buffer y agua MilliQ hasta llegar al volumen final de la digestión. En este caso la incubación se realiza a 37°C y el tiempo varía en función del enzima.

Una vez se ha realizado la correspondiente digestión ya sea analítica o preparativa, se comprobará mediante una electroforesis (analítica o preparativa) en gel de agarosa (este proceso se explica detalladamente en el apartado 4.2.8).

4.2.2. Defosforilación del DNA

Al realizar la ligación entre un inserto y un plásmido, es muy importante que este último esté perfectamente linealizado, es decir, que se haya digerido la forma nativa circular en su totalidad y se encuentre en su forma lineal. Trazas de los plásmidos circulares determinarían la transformación casi exclusiva del plásmido parental determinando el fracaso del proceso de clonación. Además, es necesario llevar a cabo la defosforilación de sus extremos siempre que sean complementarios, así se impide que el plásmido vuelva a ciclarse consigo mismo, proceso que se conoce como *self-ligation*.

La defosforilación consiste en hidrolizar el grupo fosfato del extremo 5' del fragmento de DNA, este proceso se puede realizar con dos enzimas: *rSap* y *FastAP*. En función de si se emplea una u otra las condiciones de activación e inactivación marcadas por la casa comercial varían. La primera defosforilación se realiza con la enzima *FastAP* a 37°C durante 15 minutos y se desactiva a 65°C durante 5 minutos. Con la enzima *SAP* se hace la segunda defosforilación a 37°C durante 1 hora y desactivándose a 80°C en 15 minutos.

4.2.3. Reacción de Ligación

Una vez el correspondiente plásmido ha sido linealizado y defosforilado se puede realizar la ligación de este con el inserto génico. Por lo tanto, en la reacción de ligación se introduce en el plásmido el inserto correctamente purificado y que codifica específicamente para la proteína objetivo de síntesis.

La enzima *T4* Ligasa es la encargada de catalizar esta reacción. Para llevar a cabo la reacción de manera óptima se pueden emplear distintas relaciones molares (1:1, 2:1, etc.) de plásmido y de inserto. Así, siempre se digieren 70ng de plásmido con la cantidad adecuada de inserto según sus concentraciones, a estos se adiciona la enzima (cantidad especificada por el comerciante) y el tampón *Ligase T4 Buffer* específico para la reacción. La reacción se incuba durante 1 hora a 22°C.

Para poder desarrollarse estas ligaciones es imprescindible que los extremos del plásmido e inserto sean compatibles, es decir, que las secuencias, de los salientes que se encuentran en los extremos de cada uno, sean complementarias dándose la unión entre ellos. En la Figura 10 se puede observar este fenómeno.

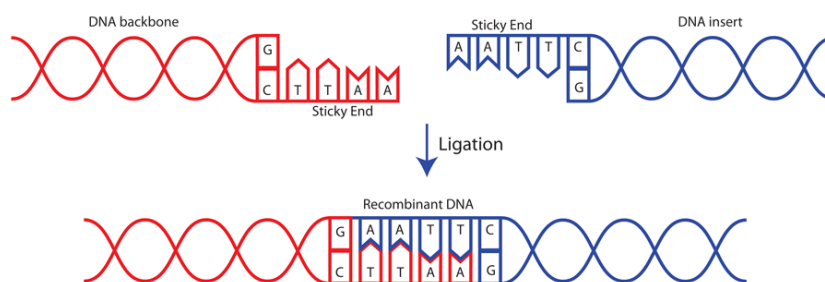


Figura 10: Reacción de ligación entre un plásmido e inserto con extremos complementarios

4.2.4. Transformación

La transformación es el proceso por el cual el material génico exógeno (DNA recombinante clonado en un vector) se introduce en una célula huésped bacteriana. En el interior de esta célula se acaba el proceso de reparación del DNA recombinante y réplica del material genético exógeno independientemente de la replicación del propio material genético de la bacteria. Por su simplicidad y eficacia, la célula huésped empleada en la transformación es *E. coli*.

En toda transformación la bacteria debe estar en lo que se conoce como *estado de competencia*, en este estado la bacteria tiene alteraciones en su membrana y pared celulares permitiendo entrar a los ácidos nucleicos en la célula, este fenómeno tiene lugar en determinadas condiciones.

En este trabajo se llevan a cabo las transformaciones empleando dos tipos de células competentes (apartado 4.1.3.2) que difieren en la eficiencia transformante, sin embargo, el protocolo que se sigue en ambos casos es muy parecido.

En el protocolo a seguir se pueden diferenciar las siguientes etapas comunes (Figura 11):

1.- Incubación de las células competentes y el DNA recombinante a 4°C, en este paso co-precipitan el DNA y las células.

2.- Shock térmico a 42°C, permite la permeabilización de la membrana celular, de este modo, el material exógeno externo se introduce en las células. Posteriormente se atempera a 4°C durante 2 minutos.

3.-Adición del medio S.O.C, medio líquido empleado para aumentar la eficiencia en las transformaciones bacterianas, e incubación durante 1 hora en la incubadora dinámica (*Selecta*) a 37°C y agitación constante. Es importante que en este paso se produzca un intercambio de aire entre el exterior e interior del tubo lo que favorece una buena oxigenación de las células transformantes y permite la recuperación de las bacterias afectada por el tratamiento.

4.-Finalizada la incubación, se siembran dos placas LB-Agar de cultivo bacteriano que contenga el antibiótico para el cual el vector plasmídico ofrezca resistencia. Una vez hecha la siembra, las placas se dejan crecer en la incubadora dinámica a 37°C durante 16 horas.

5.-Resiembra en medio líquido LB-antibiótico, para ello se seleccionan 6-8 colonias perfectamente aisladas y sin presencia de colonias satélites. Se dejan incubando en la incubadora dinámica a 37°C y 250rpm durante 16 horas.

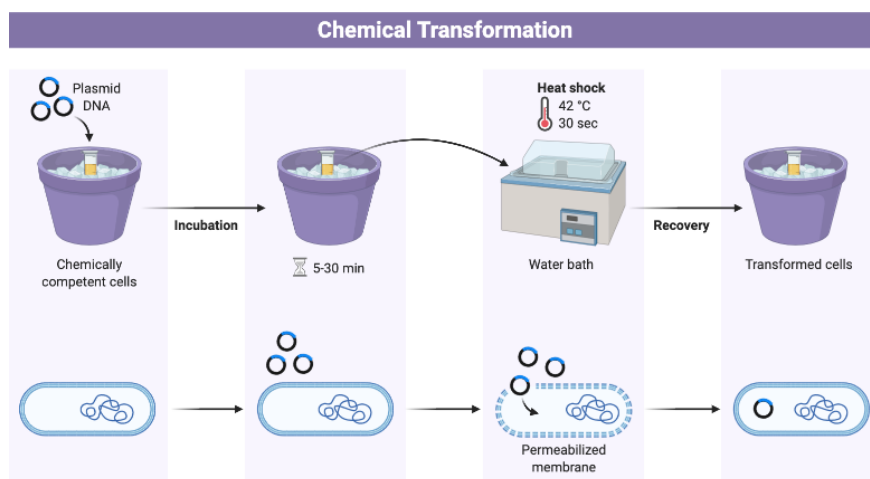


Figura 11: Representación esquemática de los pasos 1, 2 y 3 de la transformación bacteriana

En la Tabla 2 se muestran las principales diferencias entre las transformaciones empleadas (*NZY5 α Competent Grade Cells* y *BLR (DE3) Competent Cells*):

Tabla 2: Diferencias entre las transformaciones BLR (DE3) y NZY5 empleadas

	NZY5 α Competent Cells	BLR (DE3) Competent Cells
Volumen de transformación	50 μ L de células y 5 μ L de DNA	20 μ L de células y 1 μ L de DNA
Incubación a 4$^{\circ}$C	1 hora	5 minutos
Shock Térmico a 42$^{\circ}$C	40 segundos	30 segundos
Volumen de S.O.C	450 μ L	80 μ L

4.2.5. Preparación de placas Petri para cultivo bacteriano

Como se ha visto en el apartado anterior, el último paso del proceso de la transformación requiere del empleo de placas Petri-LB Agar, por lo tanto, es necesario realizar su preparación previamente.

Para su elaboración se precisa de una disolución de LB (*Lysogeny Broth*)-agar diluida en agua MilliQ. Esta se deja a 120 $^{\circ}$ C durante 20 minutos en autoclave para poder disolverse completamente y esterilizarse. A continuación, una vez el medio se ha templado, se añade la cantidad necesaria del correspondiente antibiótico y se dispensa en las placas Petri. Se deja enfriar y solidificar el medio estando listo para realizar su posterior siembra y cultivo bacteriano, el cual servirá para asegurar que la transformación se ha producido correctamente.

4.2.6. Cultivo Bacteriano en medio líquido

Para realizar el cultivo bacteriano en medio líquido se toma la placa Petri sembrada, se seleccionan 6 u 8 colonias perfectamente aisladas. A continuación, se pica cada una de las colonias con una lanza estéril y se cultivan independientemente en medio adecuado, en este caso LB, medio líquido que permite el crecimiento de las bacterias seleccionadas para la clonación, (5mL si el vector es de clonación y 10mL si es de expresión). Por último, se deja crecer el cultivo a 37 $^{\circ}$ C durante 16 horas.

4.2.7. Purificación de los fragmentos de DNA

Una vez se obtienen los plásmidos o insertos, objeto de estudio, es necesario realizar su purificación. En función del fragmento de DNA podemos seguir diferentes protocolos para purificar, no obstante, en todos los casos se determinará previamente la pureza y concentración del plásmido mediante un espectrofotómetro de micromuestra NanoDrop (apartado 4.2.10)

4.2.7.1. Purificación de DNA plasmídico de un cultivo bacteriano

El objetivo de esta purificación es extraer del citoplasma bacteriano únicamente el DNA plasmídico. Describiremos dos kits (mencionados en el apartado 4.1.7) utilizados a tal fin en este trabajo, en ambos casos el proceso es similar y viene determinado por el comerciante (Figura 12).

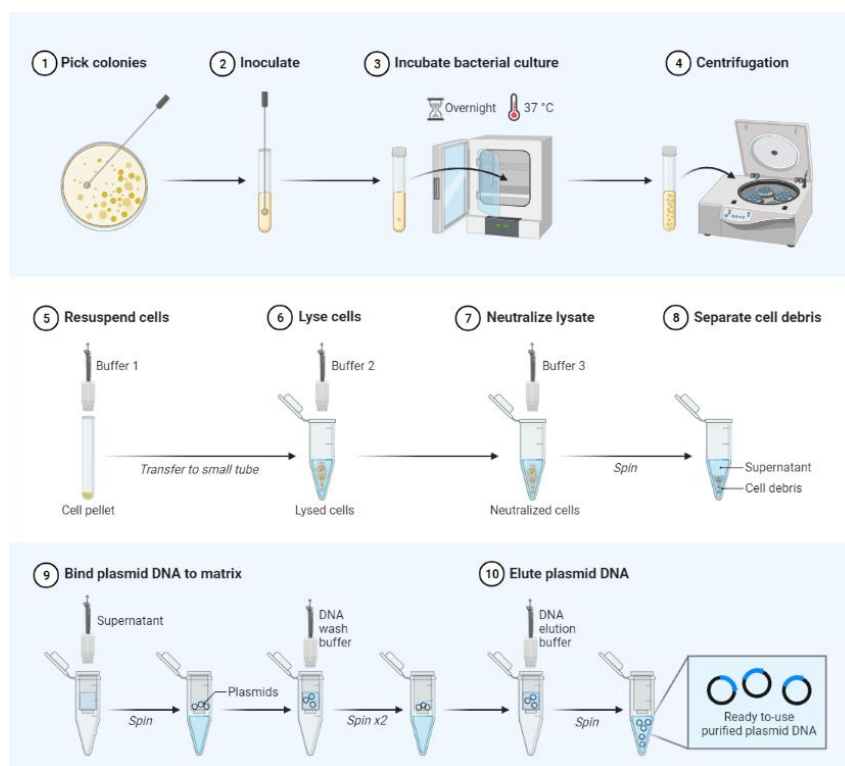


Figura 12: Esquema de pasos comunes en la purificación del DNA de un cultivo bacteriano

4.2.7.1.1. Protocolo NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid)

Para este kit se siguen los siguientes pasos:

1.-Cultivo de células Bacterianas: en primer lugar, se separan las bacterias clonadas del medio de cultivo, para ello se centrifuga el cultivo bacteriano a 12.000 xg y se elimina cuidadosamente el sobrenadante.

2.-Lisis Celular y aclarado: en este paso se adiciona el *Buffer A1*, este es el encargado de eliminar completamente el medio de cultivo en el que se reproducen las células. Este buffer, además, contiene la enzima *RNAasa* que lleva a cabo la degradación del RNA presente en la disolución. Este paso es

imprescindible para evitar que junto al DNA recombinante plasmídico se co-purifiquen otros ácidos nucleicos de tamaño similar o inferior (RNA). El siguiente tampón que se adiciona es el *Buffer A2*, este permite llevar a cabo la lisis alcalina en condiciones desnaturizantes gracias al NaOH y SDS (detergente aniónico). Estos rompen la pared celular de las bacterias permitiendo salir al DNA plasmídico al medio extracelular. Así mismo, se produce la desnaturalización de macromoléculas como el DNA bacteriano quedando los plásmidos desnaturalizados en la disolución acuosa.

El último tampón que se adiciona en este paso es el *Buffer A3*, este permite llevar a cabo la neutralización del Buffer A2 y la renaturalización de los plásmidos, que gracias a su pequeño tamaño tienen una gran estabilidad frente a estos reactivos químicos. Tras la adición del *Buffer A3* obtendremos una disolución turbia a consecuencia de la presencia de restos celulares, así se realiza una centrifugación (10 minutos a 13400 xg) que separa estos restos que quedan en el precipitado o pellet del DNA plasmídico que se encontrará en el sobrenadante.

Ambas etapas (lisis alcalina y neutralización) son cruciales para el resultado de la purificación y necesitan del control absolutos de los tiempos de incubación.

3.- Separación: en este paso se procede a la separación del DNA plasmídico obtenido en la fase líquida. Para lo cual, se carga en una mini-columna de extracción en fase sólida (SPE). El sorbente de esta columna es una membrana de sílica, la cual, muestra una gran afinidad por el DNA frente al resto de biomoléculas que se encuentran en la disolución (interferentes).

4.-Lavado de la membrana: Para poder obtener el DNA purificado es necesario eliminar los interferentes, para ello, se adiciona el *Buffer de lavado AW* (previamente calentado a 50°C). Este tampón se compone de cloruro de guanidinio, un agente caotrópico y potente desnaturizante, que solubiliza los interferentes unidos con baja afinidad ~~con~~ a la membrana de sílica, asegurando que los interferentes que se hayan quedado adsorbidos en la columna se eluyan. Después se añade el *Buffer de lavado A4* al cual es necesario añadir Etanol permitiendo eliminar los interferentes polares retenidos en la columna.

Por último, una vez que todos los interferentes son eliminados, es necesario centrifugar la columna para secarla y asegurar la eliminación total del EtOH adicionado que podría impedir las reacciones enzimáticas que se lleven a cabo en los procesos en los que se emplee este DNA plasmídico.

5.-Elución del DNA: Finalmente una vez el DNA plasmídico está perfectamente purificado y la columna seca es necesario llevar a cabo su elución, para ello se emplea el *Tampón AE* (precalentado a 70°C) que presenta más afinidad por el DNA que la propia columna.

El plásmido purificado se almacena a 4°C si se va a utilizar inmediatamente o a -20°C para almacenamientos a largo plazo.

4.2.7.1.2. Protocolo Protocolo Quantum Prep® Plasmid MidiPrep Kit

Este protocolo también se basa en una purificación con lisis alcalina, por lo tanto, los pasos anteriores a la purificación (pasos 1 al 3) se llevan a cabo substancialmente como el protocolo anterior incrementado el volumen de partida del cultivo bacteriano hasta 50mL. Después de la lisis y neutralización, la carga de la fracción soluble, los lavados y la elución se realizan con el método batch mediante etapas de incubación en suave agitación y centrifugaciones; debido a que el complejo matriz-DNA (Quantum Prep DNA binding matrix) se separa físicamente del sobrenadante por la diferencia de densidad.

4.2.8. Electroforesis de DNA

La electroforesis en gel es el proceso por el cual se separan las biomoléculas, el principio de esta técnica es la migración de estas moléculas a través de una matriz porosa, normalmente un gel, según el tamaño o peso molecular de los fragmentos. La electroforesis en gel de agarosa (no desnaturalizantes) permite separar, identificar y purificar los fragmentos de DNA o plásmidos usados u obtenidos en los procesos de clonación.

La agarosa es un polisacárido extraído de algas marinas que se mantiene en estado sólido a temperatura ambiente y, que se disuelve fácilmente a temperaturas superiores a 50°C. Este polímero lineal está formado por D-galactosa y 3,6-anhidro L-galactopiranososa y proporciona un rango de separación que oscila entre 0.05 y 60 Kpb, los rangos de separación se pueden determinar en función del porcentaje de agarosa empleado para generar el gel. En la Tabla 3 se puede observar esta relación.

Tabla 3: Relación entre el porcentaje del gel de agarosa y el rango de separación del DNA lineal

PORCENTAJE DE AGAROSA %(W/V)	RANGO DE SEPARACIÓN DE DNA LINEAL (Kpb)
0,75	10-15
1,0	0,5-10
1,25	0,3-5
1,5	0,2-4
2,0	0,1-2,5
2,5	0,05-1

Para preparar el gel se selecciona el porcentaje adecuado para separar los fragmentos de DNA, se pesa la cantidad adecuada de Seakem® LE Agarosa, se añade a un Erlenmeyer y se disuelve en de *Buffer TAE 1x*, este es un tampón de separación con pH 7.5, pH en el cual los grupos fosfato de los fragmentos de DNA están cargados negativamente, así, se asegura que la carga de todas las moléculas sea homogénea y constante, permitiendo separar las moléculas solo en función del tamaño. Para disolver la agarosa el Erlenmeyer se calienta hasta superar los 50°C, una vez se disuelve, la mezcla homogénea resultante se vierte sobre la cubeta formadora del gel y se coloca el peine que genera los pocillos.

Se deja enfriar el gel hasta que esté completamente solidificado, en este momento se transfiere el gel a la cubeta de electroforesis, se cubre con el Buffer de separación (TAE 1x) y se retira el peine. Se preparan las muestras añadiendo el DNA Loading Buffer que mantiene el pH entre 7-8, además, como se puede ver en el apartado 4.1.2 este contiene azul de Bromofenol permitiendo visualizar el avance de la electroforesis. Cargadas las muestras, se tapa la cubeta y se conectan los electrodos a la fuente de alimentación (asegurarse de que la orientación es la correcta para dar lugar a la migración desde el cátodo hacia el ánodo). Se deja corriendo el gel el tiempo suficiente hasta observar que el colorante adicionado a las muestras alcance la posición deseada en el gel. En la Figura 13 se puede ver un esquema del proceso.

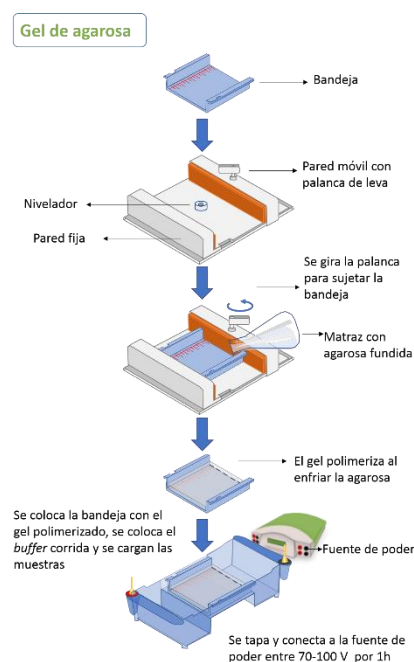


Figura 13: Esquema del proceso de preparación de electroforesis de DNA en geles de agarosa(31)

Podemos distinguir dos tipos de electroforesis: Preparativa y Analítica. Así, cuando se identifican cualitativa y cuantitativamente los diferentes fragmentos para comprobar el éxito de una reacción, se realiza una electroforesis Analítica. Sin embargo, cuando el objetivo es purificar, aislar y extraer un fragmento específico de DNA (proceso detallado en el apartado 4.2.9) se realiza una electroforesis

Preparativa, en este caso se necesita una mayor resolución, por lo que se necesita que las bandas migren mucho más despacio aplicando un voltaje menor que en las electroforesis analíticas.

Una vez finalizada la electroforesis, el gel se transfiere a un recipiente de tñido que contiene una disolución 1:10000 (v/v) de SimplySafe™ (formado por un marcador fluorescente de DNA) en Tampón TAE 1x, el gel se deja tñido durante unos minutos hasta poder tomar una imagen con el transiluminador de luz UV Gel DOC™ EZ Imager.

La migración de los distintos fragmentos de DNA depende de su tamaño, de este modo, se puede determinar la velocidad de migración (v) a partir de Ecuación 1

$$v = \mu_a \cdot E = \mu_a \cdot \frac{V}{L} \quad \text{Ecuación 1}$$

En esta ecuación μ_a corresponde a la movilidad aparente de cada especie y E el campo eléctrico aplicado entre los electrodos. Además, E es igual al potencial o voltaje aplicado entre los electrodos (V) partido por el del espaciado entre estos electrodos (L).

La movilidad electroforética no depende únicamente del tamaño de las especies sino también se ve afectada por la porosidad del medio, el tamaño de poro varía en función de la concentración de agarosa con la que se prepara el gel (cuanto mayor sea la concentración mayor será la rigidez del gel). Por lo tanto, cuanto menor sea el tamaño del poro mejor será la separación entre los fragmentos de DNA de tamaño pequeño.

Para identificar por comparación, el peso molecular de los fragmentos de DNA problemas, en la misma electroforesis se añade una muestra con un patrón de bandas de peso molecular conocido. Además, se puede realizar una semicuantificación de los fragmentos problema, para ello se lleva a cabo una línea de calibrado (gráfico comparando tamaño y recorrido de los fragmentos del marcador). Por lo tanto, se pueden semicuantificar plásmidos de entre 200-10000pb. El marcador de peso molecular utilizado es el NZYDNA *Ladder III*, un marcador para electroforesis en gel de agarosa, este produce un

patrón compuesto por 14 bandas espaciadas regularmente, que como se ve en la Figura 14 van de 200 a 10000 pares de bases (pb).

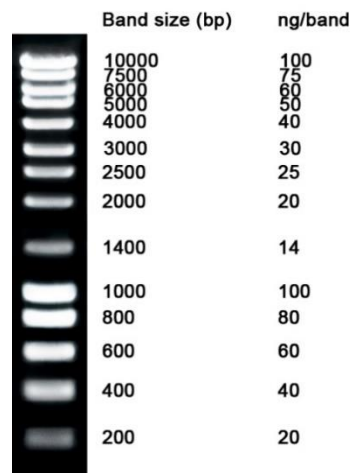


Figura 14: patrón de bandas generado por el marcador NZYDNA Ladder III. (32)

4.2.9. Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa

Para separar los fragmentos de DNA del gel de agarosa se sigue el *Protocolo PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen)*.

Una vez se realiza la correspondiente electroforesis preparativa en gel de agarosa (apartado 4.2.8) y su tinción, se puede observar la banda que corresponde a nuestro plásmido gracias a un transiluminador de luz ultravioleta y se puede aislar con un bisturí. Seguidamente, se realiza la purificación de la banda cortada empleando el protocolo de Invitrogen que se describe a continuación.

En primer lugar, se disuelve el fragmento cortado empleando el *Buffer L3* y calentándolo a 50°C durante 15 minutos. Una vez que tenemos la agarosa y el DNA disuelto se procede a su aislamiento y purificación mediante la utilización de una columna de extracción en fase sólida (SPE) que contiene una membrana de sílica. Es necesario realizar un lavado para eliminar las impurezas empleando el *Buffer de Lavado W1*, este contiene Etanol por lo que diluye tanto interferentes apolares como polares, es muy importante secar y eliminar bien todo el etanol de la columna por lo que se centrifuga. Para eluir el DNA plasmídico se usa el *Buffer de elución E5*. Por último, el DNA se almacenará a 4°C para uso inmediato o -20°C para almacenamientos a largo plazo.

Este proceso sirve exclusivamente para purificar los fragmentos de DNA linealizados, por lo que no se debe emplear con de DNA superenrollado o genómico.

4.2.10. Determinación de la concentración y análisis de la pureza de DNA

Una vez el DNA ha sido purificado se puede determinar su concentración y pureza empleando un espectrofotómetro. En este trabajo se ha utilizado un espectrofotómetro de micromuestra NanoDrop One® (Thermo Scientific). Este espectrómetro realiza un análisis de la absorbancia, inicialmente esta se puede relacionar con la concentración según la ley de Lambert-Beer (Ecuación 2). Sin embargo, en este caso se emplea una modificación de esta ley (Ecuación 3), en esta se combinan el coeficiente de extinción y el camino óptico dando un único factor ($f=1/\epsilon \cdot l$)

Ley de Lambert-Beer $A = \epsilon \cdot l \cdot c$ *Ecuación 2*

Modificación $c = A \cdot f$ *Ecuación 3*

En la ecuación 2, la A hace referencia a la absorbancia, ϵ ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) es la absortividad molar a la correspondiente λ , l (cm) es el camino óptico que recorre la radiación que atraviesa la muestra y c (mol/L) la concentración de la molécula que absorbe la radiación.

Además de la concentración este equipo permite analizar la relación de absorbancias a dos longitudes de onda diferentes, así, se puede analizar la pureza según dos índices:

-A260/280: absorbancia a 260nm en relación con la corregida a 280nm.

-A260/230: absorbancia a 260nm en relación con la corregida a 230nm.

En la Tabla 4 se recogen los rangos de pureza dados por cada índice, estos indican la presencia de algunos contaminantes como pueden ser disolventes o reactivos que se emplean en las purificaciones.

Tabla 4: Grados de pureza del DNA acordes a los valores de absorbancia para medidas con NanoDrop One

RELACIÓN	VALOR (uds. Absorbancia)	PUREZA
A260/280	>2	Contaminación con RNA
	~1.8	Pureza óptima
	<0.3-0.2	Presencia de disoluciones ácidas
A260/230	~1.8-2.2	Pureza óptima

4.2.11. Secuenciación del DNA

La secuenciación de nuestras muestras de DNA se ha realizado en Cenit Support Systems S.L., en el Parque Científico de la Universidad de Salamanca.

Una vez se obtiene el polímero recombinante tipo elastina deseado, es necesario comprobar que toda su secuencia de nucleótidos sea correcta, para ello se emplea la técnica de **Secuenciación**. De este modo podemos conocer el orden exacto de las bases nitrogenadas Adenina (A), Timina (T), Guanina (G) y Citosina (C). Para llevar a cabo esta técnica se emplea el **método Sanger**, este se encarga de degradar específicamente y fraccionar los polinucleótidos moldes en fragmentos lo suficientemente pequeños como para poder secuenciarse. Para que todos los fragmentos tengan el mismo origen se adicionan *primers* (cebadores específicos) que se encargan de reconocer una secuencia específica uniéndose a la hebra molde de DNA. Se produce la amplificación y se obtienen los **distintos fragmentos** de DNA. Para que los fragmentos tengan diferentes longitudes se emplean bases de DNA modificadas con fluorescencia (didesoxiNTPs), estos se comportan como terminadores ya que al incorporarse impiden la unión de la polimerasa deteniendo el crecimiento del fragmento copia. Los distintos fragmentos de DNA se separan en un tubo capilar en función de su tamaño. Por último, un láser mide la fluorescencia que emite la base modificada terminadora de cada fragmento y se va teniendo información de la secuencia de los nucleótidos.

4.2.12. Electroforesis de proteínas (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis SDS-PAGE)

En el caso de las electroforesis desnaturizantes de proteínas se emplean geles discontinuos de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio o SDS-PAGE (29).

Los geles de poliacrilamida se forman a partir de polimerizaciones radicalarias (Figura 15) de la mezcla de bisacrilamida y acrilamida. La formación del gel es por tanto una reacción en cadena, que se inicia mediante el persulfato de amonio (PSA) y la catalisis del TEMED y que a partir de ese momento transcurre muy rápidamente.

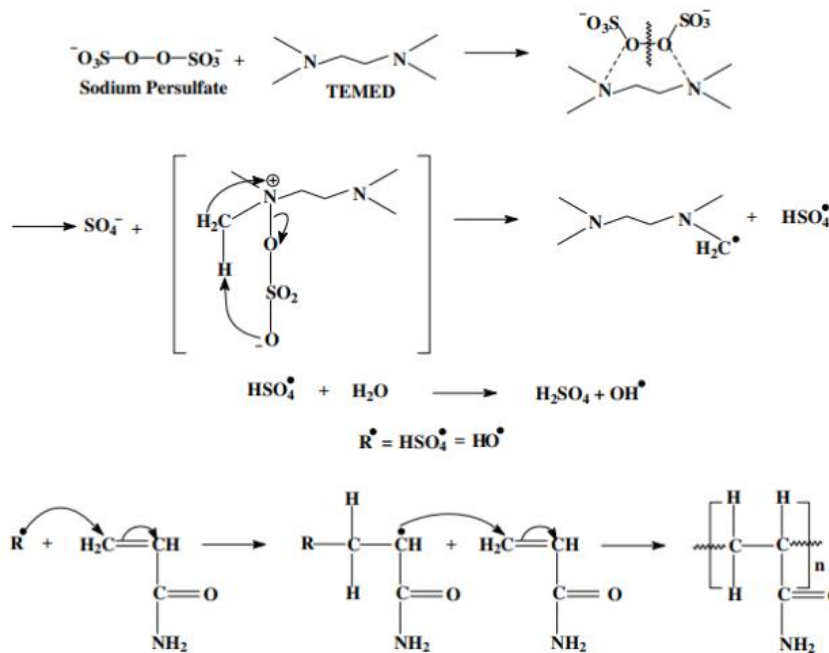


Figura 15: Mecanismo Radicalario para la formación de poliacrilamida

La adición de SDS (agente desnaturizante) en el gel de poliacrilamida permite mantener las proteínas en estado extendido o lineal, facilitando la movilidad electroforética de las proteínas a través del gel y su separación en base al peso molecular. Cada una de las moléculas del dodecilsulfato se une a dos aminoácidos, permitiendo que las moléculas que tienen el mismo número de aminoácidos se muevan con la misma velocidad de migración. Por lo tanto, el movimiento de las proteínas a través del gel depende únicamente de su tamaño. El gel se define discontinuo porque contiene dos zonas distintas:

-Gel Concentrador o Acumulador: este se sitúa en la parte superior y se encarga de concentrar las muestras en una banda estrecha haciendo que todas tengan la misma velocidad de migración, esto se consigue gracias al bajo porcentaje de acrilamida y su pH de 6.8. Este se forma a partir de una mezcla de agua MilliQ, Tris 0,5M con pH a 6.8, acrilamida al 4%(m/v), SDS al 10% (m/v) y TEMED.

-Gel Separador: este ocupa la mayor parte del gel y permite la separación de las proteínas acorde a su peso molecular ($v = \text{carga/masa}$) que se consigue gracias a dos parámetros: el porcentaje de acrilamida es superior (8-15%) y su pH de 8.8.

Una vez se forma el gel, antes de cargar las muestras es necesario adicionar sobre estas *Loading Buffer*, que contiene azul de Bromofenol permitiendo observar el avance de la electroforesis y calentar la mezcla a 100°C durante cinco minutos. Con este paso se consigue la desnaturalización de las proteínas a analizar y la reducción de los puentes disulfuros si los hubiera. A continuación, se cargan las muestras preparadas y se deja correr la electroforesis aplicando un voltaje de 25mA por cada gel.

Una vez termina la electroforesis se transfiere el gel a una disolución de tinte. En este caso para teñir el gel se emplea una disolución de cloruro de Cobre 0.3 M en agua, se deja tinte durante 5 minutos y después, se elimina el exceso de la solución de tinte con agua destilada. Una vez el gel está listo se observan las bandas con el transiluminador Gel DOC™ EZ Imager.

Para poder analizar las distintas proteínas problema, se comparan con un marcador de peso molecular. En un pocillo se carga un marcador con un patrón comparativo, este está formado por distintas proteínas de masa conocida. Se puede establecer una relación lineal entre el factor de retraso (Rf) y el logaritmo de la masa molecular de las proteínas. El factor de retraso se puede calcular a partir de la Ecuación 4.

$$Rf = \frac{\text{Distancia de migración de la proteína (cm)}}{\text{Distancia del frente (cm)}} \quad \text{Ecuación 4}$$

Se realiza un gráfico que compare estas dos componentes (Rf y logaritmo de masas) que permite determinar la masa de las proteínas de las muestras a analizar.

4.2.13. Protocolo de Bioproducción de Polímeros Recombinantes

Para poder realizar la bioproducción del polímero recombinante tipo elastina se parte de bacterias que contienen el vector de expresión pET7 derivado del vector pET-25b(+) (apartado 4.1.5.2) en el que se ha insertado el DNA codificante para el ELR. La finalidad de este proceso es expresar los genes del plásmido obteniéndose el recombinámero.

Para llevar a cabo la bioproducción se emplean bacterias de la cepa competente BLR (DE3) de *E.coli* (apartado 4.1.3.2). Las BLR son un derivado de la cepa bacteriana BL21 que permite mejorar el rendimiento de los plásmidos y ayuda a estabilizar a estos mismos cuando tienen secuencias repetitivas. Una vez se obtienen las colonias en la placa Petri con LB-Agar, se realiza un screening que

permite, por un lado, comprobar que la transformación ha sido satisfactoria y, por otro lado, determinar que colonia expresa el polímero recombinante en mayor cantidad y calidad, es decir, cual es la más productora. Partiendo de esa colonia productora, se realiza un segundo screening; para lo cual, se vuelve a sembrar en las placas LB-Agar y se repite el proceso para poder seleccionar la colonia más productora de este segundo cultivo en placa.

Partiendo de esta última colonia seleccionada se realizarán varios cultivos consecutivos para conseguir una producción óptima de la proteína.

4.2.14. Preparación de los distintos cultivos de la colonia seleccionada

El proceso de la producción comienza preparando un **pre-inóculo**, para lo cual, se adiciona en un tubo estéril de 50 mL, 5mL de medio LB con antibiótico Ampicilina y 250 µL de glucosa al 20% (m/v), la glucosa es un represor de la traducción en *E. Coli*, por lo tanto, inhibe la expresión del gen durante el crecimiento de la biomasa hasta su agotamiento. Sobre esta disolución se cultiva la colonia más productora incubándose con agitación a 37°C y 250 rpm durante toda la noche. A continuación, se prepara el **inóculo**, se toman dos Erlenmeyer de 250 mL, en cada uno se adicionan, 30 mL de medio LB con antibiótico Ampicilina, 1.5 mL de glucosa al 20%(m/v) y 100 µL del pre-inóculo. Se deja el inóculo incubando con agitación a 37°C y 250 rpm mínimo 6 horas. Con la preparación del pre-inóculo y del inóculo se favorece que la biomasa de las bacterias pueda crecer.

En el siguiente paso se lleva a cabo la **producción** en la que se produce un total de 4L (como se necesitan 2 Erlenmeyer estériles de 2L por cada litro de producción en total se emplean 10 Erlenmeyer). En cada Erlenmeyer se adiciona un total de 400 mL de medio de cultivo, según experimentos previos se ha determinado que la mezcla más adecuada para la producción se compone de 250 mL de medio TB y 150 mL de medio LB. Sobre el medio de cultivo se adiciona el antibiótico Ampicilina y, por último, se adiciona 1 mL de inóculo. Estos se dejan incubando con agitación a 37°C y 250 rpm durante toda la noche. Es importante tener en cuenta que para favorecer la aireación y con ello el crecimiento bacteriano solo se debe usar ¼ del volumen total del Erlenmeyer. Este proceso se describe en la Figura 16.

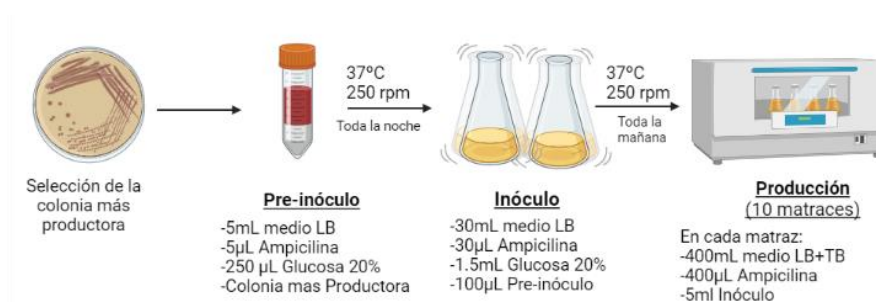


Figura 16: Esquema del proceso seguido en la bioproducción de polímeros tipo Elastina

En paralelo a la producción se preparan dos controles con los que se puede comprobar que la producción se ha producido correctamente y que el medio no contenía ningún tipo de contaminación. Así, se hace un control positivo que contiene los mismos elementos que los Erlenmeyer de la producción (5mL de medio TB, con antibiótico y 1mL de inóculo) y un control negativo o de esterilidad que se prepara del mismo modo, pero sin bacterias.

Para hacer el seguimiento del crecimiento bacteriano que nos indica el grado de producción de la proteína de interés se toman cuatro alícuotas de 1mL: dos del control positivo y dos del cultivo. A partir de estos se mide la absorbancia a 600nm. Para hacer el blanco de medición se centrifuga 45 segundos a 13400 xg y se emplea el sobrenadante. Todas las muestras se deben diluir 1:10 (v/v) para mantener los valores dentro del rango dinámico de medición. Transcurrida media hora se realiza una nueva medida de la absorbancia del crecimiento bacteriano, si este valor se mantiene constante o disminuye, indicando que el crecimiento bacteriano se encuentra en fase estacionaria, se puede terminar la incubación, pero si el valor aumenta es necesario repetir el proceso hasta que la absorbancia se estabilice.

Las muestras de inóculo y de la producción una vez son resuspendidas en agua MilliQ (Tabla 5) someten a una electroforesis SDS-PAGE con la que se puede estimar si el rendimiento de la producción es el esperado. Para preparar las muestras se sigue el procedimiento descrito en el apartado 4.2.12.

Tabla 5: Volumen empleado en la preparación de la electroforesis SDS-PAGE para resuspender muestras

<i>Absorbancia</i> _{600nm}	Volumen de agua MilliQ para resuspender (µL)
0.1-0.5	20
0.5-2.0	50
2.0-5.0	100
>5.0	200

4.2.15. **Procesado de la Biomasa**

Una vez se detiene la producción comienza el procesado de la biomasa. Este procesado consiste en dos etapas: lavado y ruptura de las bacterias productoras de la proteína de interés.

El **lavado de las células** permite eliminar los subproductos del medio de cultivo. Se reparte el contenido de los Erlenmeyer en botes de centrifuga de 1 Litro sin superar los 2/3 del volumen total del recipiente, se centrifugan durante 15 minutos a 4°C y 4200 xg se descarta el sobrenadante y a

continuación el pellet se resuspende adicionando $\frac{1}{2}$ del volumen del recipiente de Buffer de lavado, de nuevo se centrifuga utilizando las mismas condiciones. Se repite el proceso hasta que el sobrenadante queda completamente transparente e incoloro.

La segunda etapa consiste en la **ruptura de las células** que se encuentran en el pellet obtenido tras la última centrifugación en la etapa de lavado. El pellet se resuspende en Buffer de Sonicado, al que se adicionan los inhibidores de proteasas PMSF y Benzamidinio Hidrocloruro hidratado imprescindible para evitar la degradación del producto por parte de las proteasas bacterianas que se liberan durante la ruptura. La ruptura celular se realiza con ciclos de sonicación a baja temperatura (4°C) y altas presiones (1500-1800 bar), estos ciclos ayudan a disgregar las paredes y membranas celulares permitiendo la liberación del biopolímero soluble en el medio. El Sonicado se realiza en un sonicador Hielscher UP400St del grupo de investigación *ProcerealTech*.

Al finalizar la sonicación se toma una alícuota de 1mL y se centrifuga durante 45 minutos a 4°C y 13400 xg. Se separa el pellet del sobrenadante y se toman dos alícuotas de cada uno de ellos para comprobar mediante una electroforesis SDS-Page (apartado 0) que el aislamiento se ha producido adecuadamente y pudiéndose analizar en que fracción se encuentra el polímero, dato fundamental para la posterior purificación. La disolución restante del sonicado se centrifuga durante 90 minutos a 4°C y 13000 xg, y se procede a la purificación del polímero recombinante que se encuentra en el pellet.

4.2.16. Purificación de polímeros recombinantes tipo elastina

Una vez se obtiene el polímero recombinante tipo elastina es necesario llevar a cabo su purificación. Para realizar esta purificación, es necesario trabajar con sales de Guanidina 3M, estas permiten solubilizar y desnaturalizar todas las proteínas, de tal modo, que pueden solubilizar los cuerpos de inclusión presentes en el interior de las bacterias que se forman como resultado de la agregación entre proteínas mal plegadas. Antes de añadir estas sales en el pellet, es necesario que este sea previamente resuspendido en 100ml de agua destilada para evitar que se forme una mezcla gomosa. La mezcla se mantiene en agitación durante 20 horas a 4°C.

El siguiente paso es centrifugar la disolución obtenida a 13000 xg y 4°C durante 1 hora. Se tomará una alícuota tanto del sobrenadante como del pellet para su posterior análisis en electroforesis, lo cual, nos permite asegurar que nuestra proteína se encuentra en el sobrenadante.

Aprovechando las propiedades del polímero, concretamente la cola de Histidinas, se realiza una purificación final mediante columna de afinidad en condiciones desnaturalizantes. La fase sólida de esta columna está constituida por una resina cubierta de Níquel (Thermo Scientific HisPur™ Ni-NTA Resin). La cola de histidinas de polímero presenta una elevada afinidad por el níquel de la resina

permitiendo que el polímero quede retenido en la columna. Esta resina requiere de un acondicionamiento previo adicionándola 2 volúmenes (v/v) de *Buffer de Equilibrado*.

Equilibrada la resina se pasa a preparar la muestra del polímero, para ello, conocido el volumen de muestra se añade el mismo volumen de Buffer de Equilibrado y se deja pasar por la columna a temperatura ambiente hasta que el polímero este empaquetado.

Una vez cargada la muestra, la columna se lleva al cromatógrafo NGC Quest System (BioRad®), este permite realizar un gradiente desde una disolución de Guanidina 3M (con Buffer de lavado) hasta otra de Guanidina 0M, de este modo las condiciones desnaturizantes van desapareciendo lentamente permitiendo el plegamiento progresivo y correcto del polímero en la columna. Una vez finaliza este gradiente, se pasa la fase móvil a través de la columna, que contiene Imidazol, agente que presenta una afinidad por la cola histidinas mayor que la que tiene la resina.

Se analizan las fracciones obtenidas de la columna a partir de una electroforesis, así, aquellas que contengan la proteína de interés se someterán a diálisis para poder eliminar por completo los restos de imidazol y sales de guanidina. Para dializar se introduce la proteína en un bidón de 25L de agua destilada a 4°C, se realizarán cuatro cambios de bidones y el último será con agua MilliQ .

Por último, es necesario liofilizar (congelación rápida y posterior eliminación del hielo a vacío) la disolución. Una vez finalizado este paso se obtiene el polímero puro y seco, listo para realizar las correspondientes caracterizaciones fisicoquímicas.

4.2.17. Caracterización Físico-Química

Una vez obtenido el polímero recombinante tipo elastina se analizan sus propiedades físico-químicas a través de las técnicas: espectrometría de masas (MALDI-TOF), dispersión de luz dinámica (DLS), resonancia magnética nuclear (RMN).

4.2.17.1. Espectrometría de masas (MALDI-TOF)

La espectrometría de Masas (MS) de tiempo de vuelo (TOF) por láser asistida por una matriz (MALDI) es una técnica analítica para análisis cualitativo y cuantitativo que permite determinar átomos, compuestos sencillos e incluso moléculas más complejas. Actualmente es una de las técnicas más versátiles para el análisis de biopolímeros como son las proteínas. El MALDI es una fuente de ionización muy débil (no produce fragmentación molecular) y el analizador TOF trabaja en un rango de masa/carga (m/q) casi ilimitado.

El principio general de la espectrometría de masas es generar, separar y detectar iones en fase gaseosa. Se pueden distinguir varias etapas en este proceso.

En primer lugar, la muestra se encuentra en el espectrómetro de masas. En este, una fuente ionizante (láser) bombardea la muestra (disuelta en una disolución hidroalcohólica) que está embebida en una matriz (absorbe fuertemente la radiación láser y debe ser lo suficientemente soluble en el disolvente de la muestra como para que haya un gran exceso en la mezcla sólida que se deposita en la sonda). Esta mezcla se deposita sobre una placa metálica y se deja evaporar formándose un residuo cristalino, sobre el que incide la radiación UV-Vis (láser pulsante que evita que la muestra se degrade), la matriz absorbe la radiación, y la reemite a la muestra, produciéndose la desorción de los iones.

Los iones obtenidos pasan al analizador de tiempo de vuelo, donde son sometidos a campos eléctricos o magnéticos que permiten desviar sus trayectorias iniciales. Dependiendo de la masa y velocidad que posean, la desviación que sufren será mayor o menor. Se va variando el valor del campo que se aplica, dirigiéndose los iones con distintas masas (en orden creciente o decreciente) hacia el colector, donde se genera una señal eléctrica que se amplifica y genera el espectro de masas.

El espectro de masas que se obtiene representa la abundancia relativa frente a la relación masa/carga (m/z).

El equipo utilizado en este trabajo es el espectrómetro de masas MALDI-TOF Bruker Autoflex® del Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de Valladolid. El equipo fue manipulado por técnicos del mencionado laboratorio.

4.2.17.2. Espectroscopía DLS (Dynamic Light Scattering)

La dispersión de luz dinámica (Dynamic Light Scattering) o DLS es una técnica no invasiva que permite medir el tamaño y la distribución de tamaño de moléculas y partículas en la región submicrométrica (de 1nm a 1 μ m).

Esta técnica se fundamenta en el movimiento Browniano que se define como el movimiento aleatorio de las partículas en disolución. Este movimiento es el resultado de las colisiones térmicas entre las moléculas de disolvente y las partículas de interés. Las partículas más pequeñas difunden más rápido que las largas debido a que sufren más colisiones.

El DLS permite medir el tamaño hidrodinámico que se define como el tamaño de una esfera que difunde con la misma velocidad que la partícula que se está midiendo. La esfera está formada por el core de la partícula más otros iones o polímeros absorbidos a su superficie.

Se iluminan las partículas con un láser de Helio-Neón y estas dispersan parte de la luz. Si las partículas están completamente quietas proporcionarán una intensidad constante de la luz dispersada. Sin

embargo, debido al movimiento de difusión de las diferentes partículas, al detectar el conjunto de luz dispersada se observa una intensidad que fluctúa continuamente. La velocidad con la que varía la intensidad depende de la velocidad de difusión de las partículas. Por lo tanto, si las partículas más pequeñas difunden más rápido se obtiene un mayor número de fluctuaciones y viceversa.

A partir de las fluctuaciones de intensidad se conoce la velocidad del movimiento Browniano, y mediante la ley de Stokes-Einstein (Ecuación 5) se obtiene el tamaño de partícula.

$$d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde d_H es el radio hidrodinámico, k la constante de Boltzmann, T la temperatura, η la viscosidad y D el coeficiente de difusión.

Como se puede ver la viscosidad de los disolventes depende de la temperatura. Por lo tanto, es imprescindible realizar las medidas a una temperatura conocida.

Gracias a esta técnica se puede determinar la temperatura de transición del polímero estudiado, ya que la transición del polímero se traducirá en un aumento de tamaño debido al autoensamblaje de la partícula, pasando de tamaños de 10-20 nm en la molécula a 100-200 nm en la partícula.

Esta técnica se lleva a cabo en un equipo Zetasizer Pro perteneciente al Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de Valladolid.

4.2.17.3. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica espectroscópica de absorción de mucho uso en la investigación de estructuras o cinéticas químicas de sistemas bioquímicos. Muchas estructuras se pueden determinar exclusivamente mediante espectroscopía RMN, pero es habitual acompañar esta técnica con otras espectroscopías.

Esta técnica permite el estudio de núcleos magnéticamente activos, es decir, aquellos núcleos que presentan un momento rotacional y por ende un número cuántico de espín (I) distinto de cero. En ausencia de campo magnético externo, los spines se orientan al azar, sin embargo, cuando se coloca la muestra en un campo magnético se produce un desdoblamiento de los niveles energéticos, es decir, aparecen dos niveles, el de mínima energía, conocido como nivel de espín α , en el que los núcleos con espín positivo se colocan en la misma dirección del campo y el estado de espín β , de mayor energía, en el que los núcleos con espín negativo se orientan en la dirección opuestas.

Empleando esta técnica se puede hacer una comparación entre los protones teóricos del polímero objeto de estudio y los protones experimentales que muestra el espectro.

Se lleva a cabo el análisis de 2 mg del biopolímero B8(EI)2H6 disueltos en 700 µL de agua deuterada.

El equipo empleado consta de un espectrómetro de 500 Hz de Agilent Technologies, este es manipulado por técnicos del Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) del Parque Tecnológico de la Universidad de Valladolid.

4.2.18. Caracterización Funcional

4.2.18.1. ELISA

La técnica ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) es un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas que utiliza la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo para identificar y cuantificar el antígeno de interés, obteniéndose un producto coloreado.

En este trabajo se realiza un ELISA indirecto, en el que se fija el antígeno VEGF a la placa y permite ver si el scFv del polímero sintetizado se une o no a él, de este modo se puede determinar si el polímero es funcional. Para llevar a cabo el experimento se sigue el siguiente procedimiento:

El primer paso consiste en realizar un *Coating* o recubrimiento de la placa Medisorp (ThermoFisher), adicionando 100 µl de una disolución del antígeno VEGF (1 ng/ µl) en tampón $NaHCO_3/Na_2HCO_3$ por pocillo. Al mismo tiempo, se prepara un control negativo, para ello se emplea BSA 1ng/µl en tampón $NaHCO_3/Na_2HCO_3$. Además, se emplea una disolución de 1ng/µl del ELR, scFv(B8)(EI)2-H6, que actúa como control positivo. Adicionadas las disoluciones en los respectivos pocillos se deja fijando durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se llevan a cabo 3 lavados con 200 µl de TBS 1x y se bloquea con 200 µl de BSA 5% en TBS durante 90 minutos a 37°C.

Transcurridos los 90 minutos, se añaden en los pocillos recubiertos con el antígeno 100 µl de las disoluciones preparadas a diferentes concentraciones en BSA 0,5% del polímero de interés y del control negativo. Se realizan otros tres lavados con 200 µl de TBS 1x.

A continuación, se adiciona la Biotina-proteína L (genScript) en concentración 1:50000 (v/v) en BSA 0.5% y se deja a 37°C durante 1 hora, después se realizan otros tres lavados con TBS 1x. Finalizados los lavados se añade la streptavidina-HRP(GenScript) con concentración 1:100000(v/v) en BSA 0,5%. Se deja incubando a 37°C durante otra hora y se repiten los tres lavados con 200 µl de TBS 1x.

Finalmente, se adicionan 100 µl en cada pocillo del sustrato O-Phenylenediamine Dihydrochloride Stable Peroxide (OPD 1x). Este es un sustrato cromogénico que permite observar la actividad enzimática de la peroxidasa del rabano, HRP.

Para medir la absorbancia se emplea el equipo SpectraMax® M Series Multi-Mode Microplate Readers (Molecular Devices) a 450nm perteneciente al IOBA (Instituto de Oftalmobiología Aplicada de la Universidad de Valladolid).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. CONSTRUCCIÓN DEL GEN pET7-scFv(B8)-(E1)2-H6

La finalidad de este trabajo es clonar el gen scFv(B8)-(E1)2-H6 con el vector pET7 (Figura 17) para poder realizar una posterior bioproducción del polímero recombinante tipo elastina scFv(B8)-(E1)2-H6.

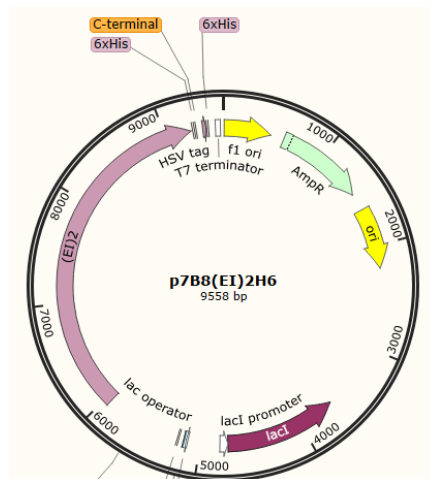


Figura 17: Esquema del gen pET7-scFv(B8)-(E1)2-H6

Observando la Figura 18 se puede ver como el polímero recombinante scFv(B8)-(E1)2-H6 está constituido por tres bloques. El bloque scFv(B8) es un fragmento de anticuerpo que actúa como agente de direccionamiento específico, es capaz de identificar y unirse al factor de crecimiento endotelial vascular 165, $VGEF_{165}$, el siguiente bloque está formado por el tetrabloque (E1)2 (apartado 2.4.1.1) y por último, el bloque H6 que contiene seis histidinas que es indispensable para poder realizar la purificación del polímero.

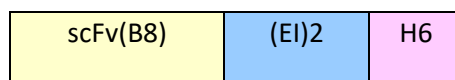


Figura 18: Representación esquemática del polímero scFv(B8)-(E1)2-H6

Se decide fusionar el tetrabloque (E1)2 con el fragmento variable, scFv, en lugar de con el anticuerpo completo porque los fragmentos scFv interactúan más rápido con su blanco en el organismo y se

eliminan más rápidamente de la sangre, que los anticuerpos completos, disminuyendo la posible toxicidad (22). Este biopolímero se puede emplear en Biomedicina para la encapsulación de fármacos que se vehicularizan hasta las células endoteliales vasculares, ya que es en la membrana plasmática de estas células donde se da la unión específica del scFv(B8) con el factor de crecimiento endotelial-vascular.

5.1.1. Descripción de la construcción del gen pET-scFv(B8)-(EI)2-H6

Para conseguir el gen pET7-scFv(B8)-(EI)2-H6 se siguen varias etapas.

En la **primera etapa** se **construye el inserto scFv(B8)-(EI)2**, para ello se introduce en el vector de clonación pD-(EI)2 el inserto scFv(B8), se realiza la correspondiente reacción de ligación, transformación y purificación (apartados 4.2.3, 4.2.4 y 4.2.7 respectivamente), este último paso es imprescindible para que las siguientes reacciones ocurran de manera precisa, evitando la formación de otros productos. Una vez se obtiene el plásmido purificado, el siguiente paso será realizar la correspondiente digestión preparativa con la enzima *EarI* para escindir el inserto scFv(B8)-(EI)2 del vector de clonación. Esta primera etapa se esquematiza en la Figura 19

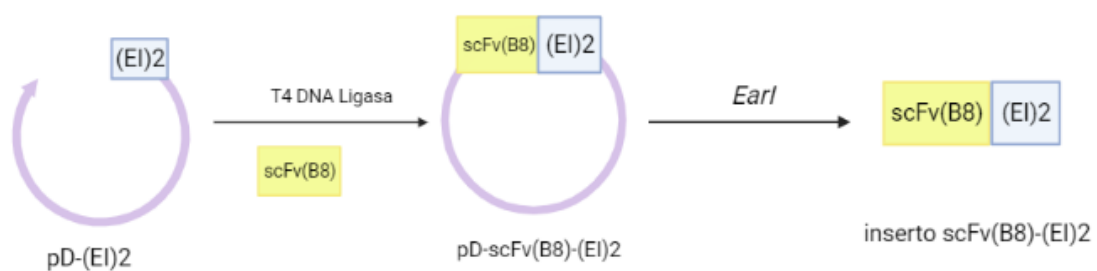


Figura 19: Esquema de la reacción de ligación del plásmido pD-(EI)2 con el inserto scFv(B8) para dar lugar al plásmido pD-scFv(B8)-(EI)2 y posterior digestión preparativa para la escisión del inserto scFv(B8)-(EI)2

La **segunda etapa** es obtener el **gen pD-scFv(B8)-(EI)2-H6**, se comienza linealizando el vector de clonación pD-H6 con la enzima de restricción SapI. Esta endonucleasa presenta un único sitio de reconocimiento que se encuentra entre el extremo 5' próximo a las Histidinas (H6) y el extremo del vector de clonación que está unido a él. Una vez linealizado el plásmido, se realiza la defosforilación de los extremos 5' fosforilados con las enzimas rSap y FastAP. Con estas enzimas se evita que el plásmido linealizado, y que posee extremos cohesivos, pueda volver a ciclarse evitando que se dé una

correcta clonación, es decir, el vector de clonación linealizado y defosforilado podrá ligarse al inserto obteniéndose el plásmido recombinante. (Figura 20)

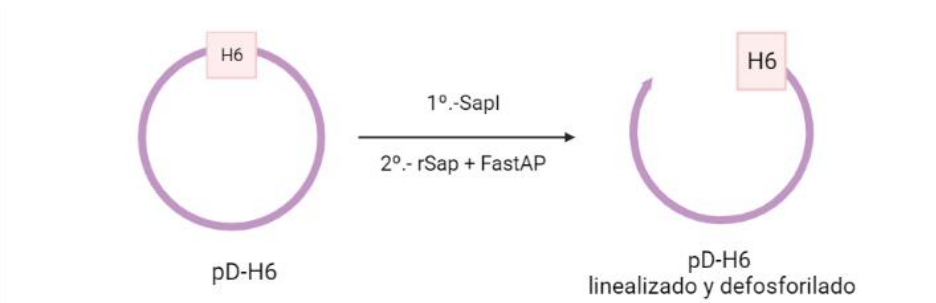


Figura 20: Esquema de linealización y defosforilación del vector de clonación pD-H6

En la **tercera etapa** se realiza la correspondiente reacción de ligación y transformación para introducir el inserto obtenido en la primera etapa, scFv(B8)-(E1)2, en el vector ya linealizado y defosforilado pD-H6. De este modo **se obtiene el plásmido pD-scFv(B8)-(E1)2-H6** que se purifica (Figura 21)

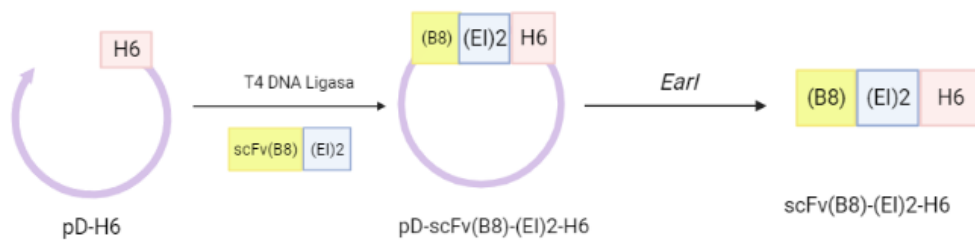


Figura 21: Esquema de reacción de ligación del vector de clonación (pD-H6 con el inserto (scFv(B8)-(E1)2 (ETAPA I)) y la escisión del gen de interés (ETAPA II)

Finalmente, El gen obtenido, scFv(B8)-(E1)2-H6, se introduce en el vector de expresión, pET7 (apartado 4.1.5.2). El gen completo se escinde empleando EarI que digiere a sus extremos. Se purifica el gen y se realiza su correspondiente reacción de ligación con el vector de expresión pET7, previamente linealizado, defosforilado y purificado (Figura 22). La subclonación con el vector de expresión permite aumentar la capacidad de síntesis del polímero recombinante.

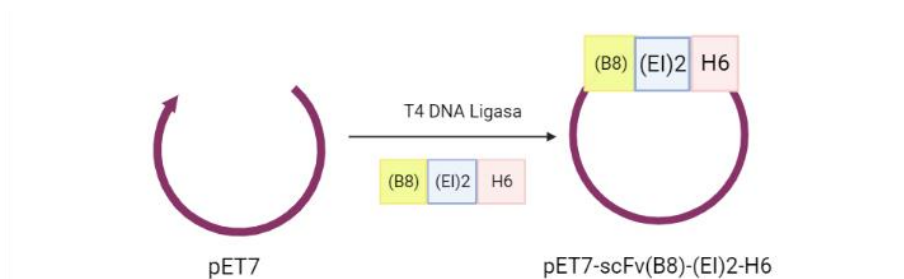


Figura 22: Esquema de la Reacción de ligación del vector de expresión pET7 y el gen scFv(B8)-(E1)2-H6

5.1.2. Síntesis Experimental del gen pET7-scFv(B8)-(EI)2-H6

5.1.2.1. Construcción del inserto scFv(B8)-(EI)2 y reacción de ligación con el vector pDA-H6

5.1.2.1.1. Reacción de ligación del plásmido pDA-(EI)2 y el inserto scFv(B8)

El primer paso en la construcción del inserto scFv(B8)-(EI)2 consiste en la ligación (Figura 19 apartado 4.2.3) del plásmido pDA-(EI)2 y el inserto scFv(B8). A continuación, se emplean las células competentes NZY5 α para llevar a cabo la correspondiente transformación (apartado 4.2.4). Tras la transformación, teniendo en cuenta que el vector de clonación pDA lleva incorporado los genes de resistencia a los antibióticos Ampicilina y Kanamicina (Figura 23-A), se hace el cultivo de las células transformadas en medio LB-Amp-Kan. El DNA plasmídico se purificará siguiendo el protocolo *NucleoSpin® Plasmid/Plasmid Nolid* (apartado 4.2.7.1.1). Una vez finaliza el proceso es imprescindible comprobar que la reacción de ligación y la transformación han sucedido correctamente, para ello se realiza una digestión analítica de la disolución plasmídica obtenida de cada colonia con el enzima *EarI* (Figura 23-A). Realizando la electroforesis analítica en gel de agarosa de las digestiones realizadas (Figura 23-B) se pueden observar los sitios de corte originados. Así, en las colonias uno y de la tres a la seis, el tamaño de la banda es el que presenta el gen scFv(B8)-(EI)2 (4026 pb), por lo tanto, en estos casos la clonación ha sido exitosa. En el caso de la colonia 2 el resultado no es el esperado ya que aparece una banda próxima a 6000 pb. Se selecciona la colonia número 3 para continuar con la escisión del inserto scFv(B8)-(EI)2.

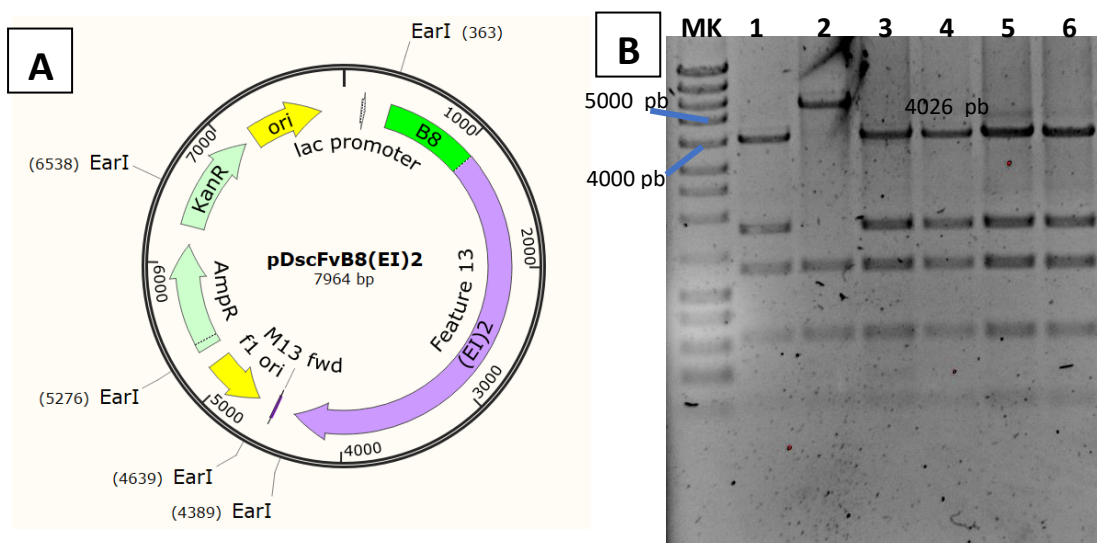


Figura 23: Panel A: Esquema del plásmido pDA-scFv(B8)-(EI)2 indicando los sitios de restricción con el enzima *EarI*. Panel B: electroforesis en gel de agarosa de la digestión analítica del plásmido con el enzima *EarI*. Calles: MK: marker NDZLadderIII; Calles 1-6: colonias

5.1.2.1.2. Escisión del inserto scFv(B8)-(E1)2

Una vez se obtiene de forma exitosa el plásmido pDA-scFv(B8)-(E1)2 se pasa a escindir el inserto de interés scFv(B8)-(E1)2 del vector de clonación pDA empleando la colonia 3 seleccionada. Para lo cual se realiza la electroforesis preparativa en gel de agarosa y la escisión del inserto (apartado 4.2.8)(Figura 24).

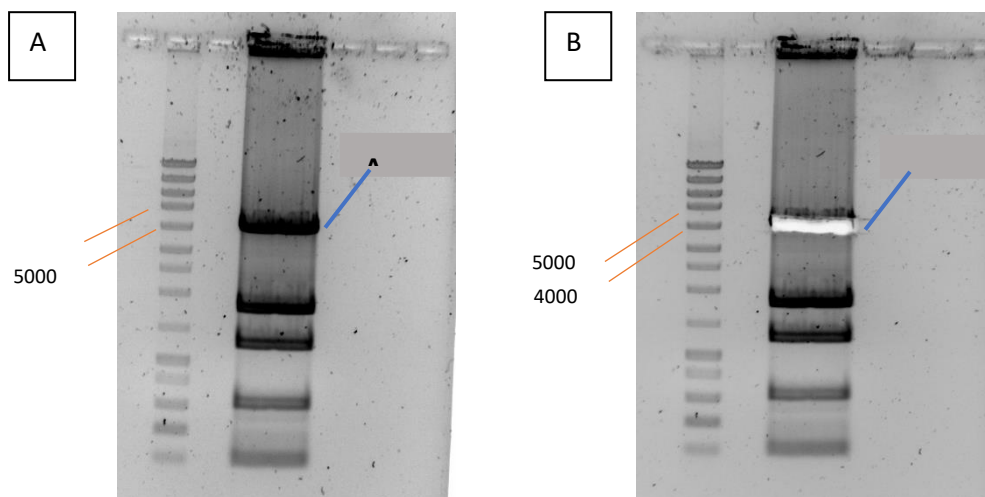


Figura 24: Electroforesis en gel de agarosa 1% (m/V) de la digestión preparativa con *EarI* del plásmido pDA.scFv(B8)-(E1)2. En la calle Mk se representa el marcador NZYLadderIII. La calle 1 corresponde al inserto scFv(B8)-(E1)2 antes (A) y después (B) de cortar la banda.

En el panel A podemos ver la banda correspondiente a nuestro inserto scFv(B8)-(E1)2 (4026 pb) y en el panel B se ve como esa misma banda se ha escindido del gel. La banda obtenida se purifica siguiendo el protocolo *PureLink Quick Gel Extraction* (apartado 4.2.9). Por último, se mide su concentración en el espectrofotómetro NanoDrop One y se obtiene un valor de 13,7 ng/μL.

Una vez se tiene el inserto scFv(B8)-(E1)2 se puede realizar la reacción de ligación con el vector de clonación pDA-H6 que permite obtener el plásmido pDA-scFv(B8)-(E1)2-H6. A continuación se explican las etapas seguidas en el proceso de esta síntesis.

5.1.2.1.3. Linealización y defosforilización de pDA-H6

Para poder trabajar con el vector de clonación pDA-H6 es preciso linealizarlo, para ello se usa la enzima de restricción *SapI* siguiendo el protocolo de la casa comercial. Una vez está perfectamente linealizado, se realiza la defosforilación de sus extremos para evitar que el plásmido se pueda ciclar espontáneamente (Self-Ligation) perjudicando la ligación, para defosforilar se emplea la enzima *FastAP*

Tras realizar ambas digestiones y comprobar con una electroforesis analítica que las digestiones han ocurrido correctamente (en este caso hay que tener en cuenta que sólo se debe obtener un fragmento de 3988 pb) se realiza una electroforesis preparativa en gel de agarosa (apartado 4.2.8) que se muestra en la Figura 25.

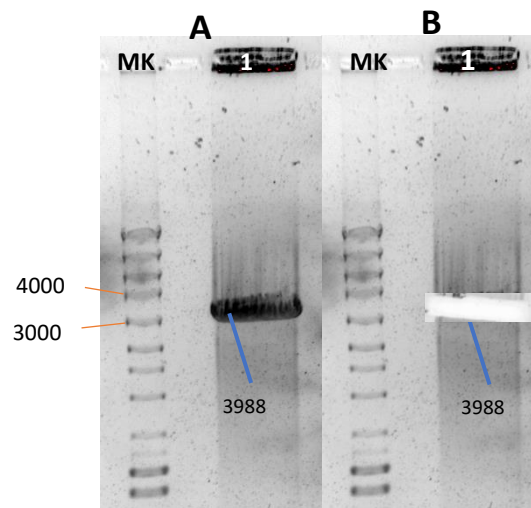


Figura 25: Electroforesis en gel de agarosa 1% (m/V) de la digestión preparativa con Earl del plásmido pDA.scFv(B8)-(EI)2. En la calle Mk se representa el marcador NZYLadderIII. La calle 1 corresponde al inserto scFv(B8)-(EI)2 antes (A) y después (B) de cortar la banda.

En la Figura 25 se pueden diferenciar dos paneles, en el panel A se diferencia una banda próxima a 4000 pb que corresponde al plásmido pDA-H6 (3988 pb) linealizado y en el panel B se ve como la escisión de esta banda a partir del gel es completa. A continuación, se purifica la banda obtenida según el protocolo *PureLink Quick Gel Extraction* (apartado 4.2.9). Por último, se determina la concentración del plásmido pDA-H6 con el espectrofotómetro NanoDrop One (4.2.10). En este caso la concentración es de 50,7 ng/ μ L.

Una vez el plásmido se escinde del gel y se purifica, se le somete a una segunda defosforilación con la enzima *rSAP* para asegurar que los extremos estén perfectamente defosforilados, la mínima presencia de trazas del producto inicial no defosforilado puede perjudicar la clonación ya que la capacidad de unión de los extremos cohesivos es muy superior a la de las dos moléculas (plásmido e inserto) presentes en la disolución.

5.1.2.1.4. Reacción de ligación del plásmido pDA-H6 y del inserto scFv(B8)-(EI)2 para formar el gen pDA-scFv(B8)-(EI)2-H6

Una vez se tiene el inserto scFv-(B8)-(EI)2 perfectamente purificado y con una concentración de 13,7 ng/ μ L y el vector plasmídico pDA-H6 linealizado y defosforilado, con una concentración de 50,7 ng/ μ L, se puede realizar su correspondiente reacción de ligación.

Se comprueba que el proceso de ligación se ha producido correctamente, para ello se realizan las digestiones analíticas descritas en el apartado 5.1.2.1.1, se emplean las endonucleasas *EcoRI* y *EarI* generándose los fragmentos de corte en el vector pDA descritos en la Figura 26, y el fragmento correspondiente al gen scFv(B8)-(E1)2-H6, en el caso de la enzima *EcoRI* este será de 4177 pb y para la enzima *EarI* de 4077 pb.

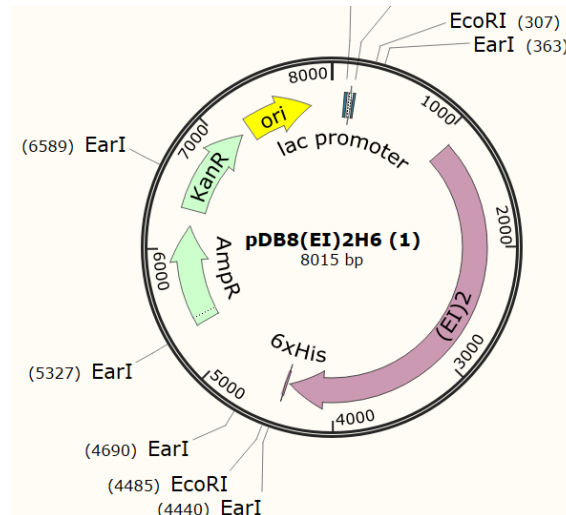


Figura 26: Esquema de los sitios de corte de las enzimas *EcoRI* y *EarI* en el gen pDA-scFv(B8)-(E1)2-H6

5.1.2.1.5. Escisión del inserto scFv(B8)-(E1)2-H6 del vector de clonación.

Una vez se tiene el gen pDA-scFv(B8)-(E1)2-H6, se ha de escindir el inserto de interés scFv(B8)-(E1)2-H6 del vector de clonación pDA para introducirlo posteriormente en un vector de expresión, pET7.

Para obtener el inserto, se realiza una digestión con el enzima *EarI*, escindiendo el fragmento scFv(B8)-(E1)2-H6, de 4077 pb, justo por los extremos que lo unen al vector plasmídico. Tras comprobar con una digestión analítica que la digestión ha ocurrido correctamente, se realiza la electroforesis preparativa en gel de agarosa (apartado 4.2.8). En el panel A de la Figura 27 se puede observar cómo tras la correcta digestión se obtiene una banda (superior a la banda de 4000 pb del marker) que corresponde al fragmento génico de interés. Este, como se ve en el panel B, se extrae del gel y purifica siguiendo el protocolo *PureLink Quick Gel Extraction* (apartado 4.2.9).

Se emplea el espectrofotómetro NanoDrop One® para medir la concentración de scFv(B8)-(E1)2-H6 y se obtiene un valor de 14,3 ng/μL.

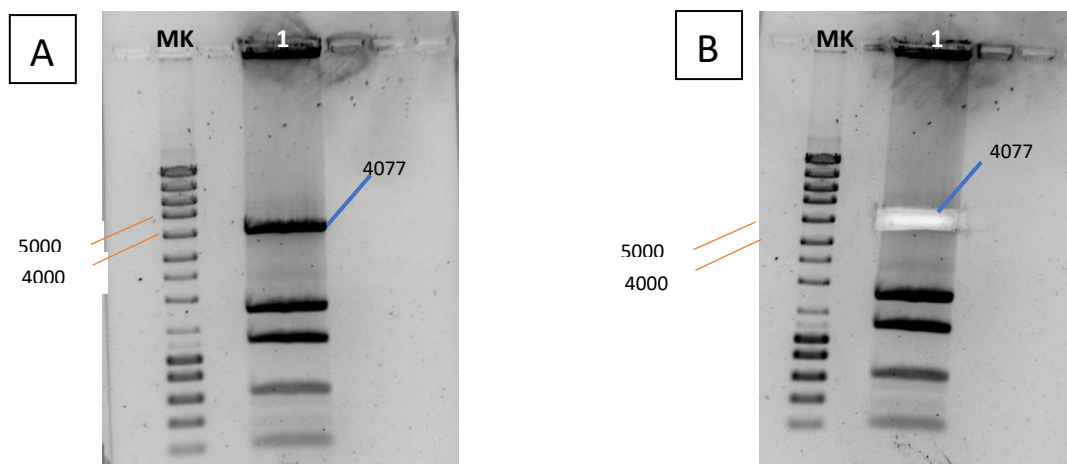


Figura 27: Electroforesis preparativa del plásmido pDA-scFv(B8)-(EI)2-H6 con las enzimas *EcoRI* y *EarI* en gel de agarosa 1%. en la calle MK se sitúa el marcador NZYLadderIII. En la calle 1 se ve el inserto scFv(B8)-(EI)2-H6 antes (panel A) y después (panel B) de cortar la banda.

5.1.2.2. Construcción del gen pET7-scFv(B8)-(EI)2-H6

5.1.2.2.1. Reacción de ligación del plásmido pET7 y del inserto scFv(B8)-(EI)2-H6 para generar el gen pET7-scFv(B8)-(EI)2-H6

Una vez se consigue el inserto scFv(B8)-(EI)2-H6, se subclona con el vector de expresión pET7 (apartado 4.1.5.2).

Para lo cual, el vector plasmídico pET7 purificado y defosforilado (Figura 22-apartado 4.2.4), se liga con el inserto scFv(B8)-(EI)2-H6 y siguiendo el protocolo del apartado 4.2.4 se lleva a cabo el proceso la transformación empleando las células competentes NZY5 α . A continuación, sabiendo que el vector de expresión pET7 solo presenta un gen de resistencia a la Ampicilina, se realiza el cultivo de las células en medio LB-Ampicilina. Por último, se realiza la purificación del plásmido pET7-scFv(B8)-(EI)2-H6 según el protocolo NucleoSpin® Plasmid/Plasmid NoLid (apartado 4.2.7.1.1)

Para comprobar que la clonación y transformación se han producido como se requiere, se realizan dos digestiones analíticas. En la primera se emplea el enzima de restricción *XbaI* que debería generar un único fragmento de restricción de 9623 pb. En la segunda digestión analítica, se realiza una primera digestión con la endonucleasa *XbaI* que linealiza el plásmido, y a continuación se emplea el enzima *HindIII*, que realiza un segundo corte, debiéndose generar dos fragmentos de restricción, uno de 5393 pb que corresponde únicamente al vector de expresión y otro de 4230 pb que está compuesto por el gen scFv(B8)-(EI)2-H6 de 4077 pb y un pequeño fragmento de 153 pb del vector pET7.

En la Figura 28 se puede ver como la única colonia en la que se llega a producir correctamente la clonación es la 6, ya que en el Panel A donde se muestra el resultado de la digestión con el enzima *XbaI*, es la única colonia con la que se obtiene la banda de ≈ 9623 pb, además en el Panel B, donde se muestran los resultados de la digestión con los enzimas *XbaI* y *HindIII*, es la única colonia que genera las dos bandas correspondientes de 5393 pb y de 4230pb. En ambos paneles (A y B) se puede ver como en el resto de las colonias se produce Self-Ligation obteniéndose una banda de 5393.

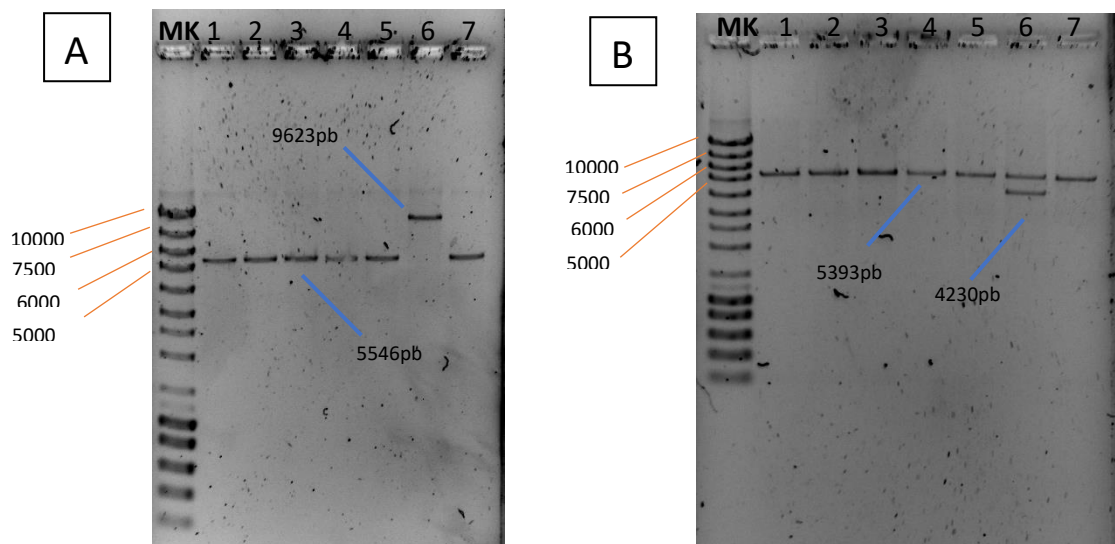


Figura 28: Panel A: digestión analítica de las colonias 1-7 del plásmido pET7-scFv(B8)-(EI)2-H6 con el enzima *XbaI*. Panel B: digestión analítica de las colonias 1-7 con los enzimas *XbaI* y *HindIII*. En la calle MK se sitúa el marcador NZYLadderIII.

Se mide la concentración de la colonia 6 con el espectrofotómetro NanoDrop One®, se obtiene un valor de 61,6 ng/ μ L.

Se llevó a cabo la secuenciación del plásmido pET7-scFv(B8)-(EI)2-H6 obtenido de la colonia 6. La secuenciación se llevó a cabo en Cenit Support Systems S.L., Parque Científico de Salamanca (Villamayor) Tras comprobar la secuencia del plásmido pET7-scFv(B8)-(EI)2-H6, se observa una mutación en el extremo N-terminal que incluye el principio del gen de interés. En la Figura 29-A se muestra la secuencia correcta que se esperaría del plásmido pET7-scFv(B8)-(EI)2-H6 En la Figura 29-B

se puede observar como la secuencia analizada carece de los cinco primeros aminoácidos, V-E-V-Q-L, correspondientes al fragmento scFv(B8) encontrándose una mutación.

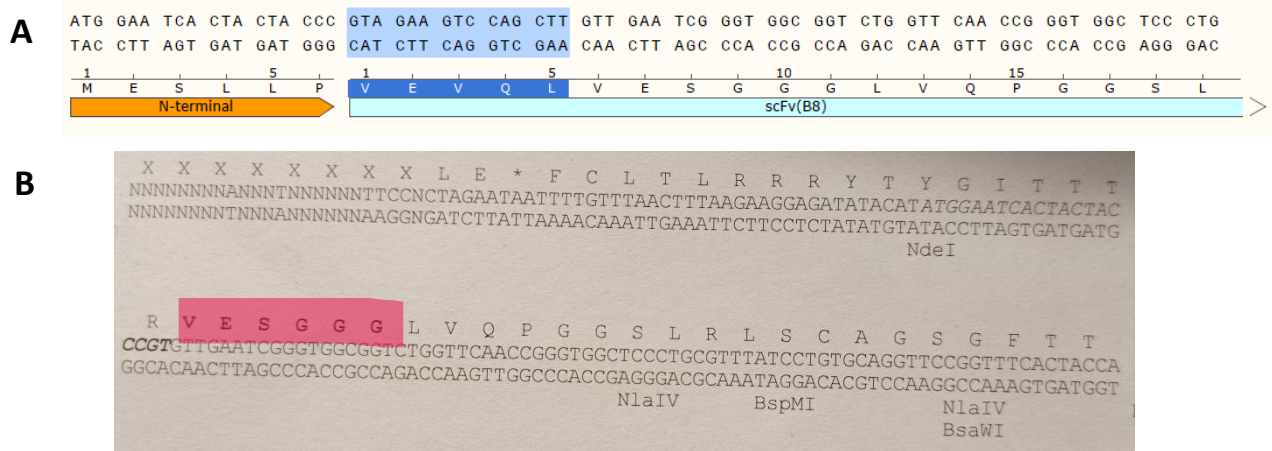


Figura 29: Comparación de la Secuencia correcta con la Secuencia obtenida. Panel A: Secuencia correcta que se debería de haber obtenido, en azul se marcan los aminoácidos que difieren al comparar esta secuencia con la secuencia del plásmido obtenido. Panel B: Secuencia del plásmido pET7-scFv(B8)-(EI)2-H6 analizado en Cenit Support Systems S.L., en rosa se marca donde comenzaría la secuencia correspondiente al scFv(B8).

2. SECUENCIACIÓN DEL PLÁSMIDO pET7-scFv(B8)-(EI)2-H6

Se establece una **estrategia para corregir esa mutación**. Se emplea un plásmido pET7-B8(EI)2 que no posee la mutación, así a partir de la correspondiente digestión se escinde el inserto que contendrá el fragmento sin mutar. Simultáneamente se trabaja con el plásmido, pET7-scFv(B8)-(EI)2-H6 que posee la mutación, realizándose en este la misma digestión, pero en este caso se escinde la mutación quedándonos con el resto del plásmido. A partir de estos dos fragmentos se irá trabajando para obtener el gen corregido. A continuación, se describe el proceso con mayor detalle.

5.2.1. Descripción de la corrección de la mutación del gen pET7-scFv(B8)-(EI)2-H6

Tal y como se muestra en la Figura 30, se comienza trabajando en paralelo con los plásmidos pET7-B8(EI)2 sin mutación y pET7-scFv(B8)-(EI)2-H6 mutado. En ambos casos se realiza una digestión con el enzima *BamI*, que linealiza ambos plásmidos cortando justo antes de la mutación. Una vez los plásmidos son linealizados se realiza una segunda digestión con el enzima *XbaI*, con esta se corta algunos pares de bases después de la mutación, de tal forma que se consigue escindir el fragmento que en el caso del gen pET7-scFv(B8)-(EI)2-H6 contiene la mutación, mientras que el fragmento que se escinde en el plásmido pET7-scFv(B8)-(EI)2 es el inserto que no contiene la mutación.

Una vez se tiene por un lado el gen pET7-scFv(B8)-(EI)2-H6 linealizado y sin el fragmento que contiene la mutación y por otro el inserto escindido de pET7-scFv(B8)-(EI)2, se realiza la reacción de ligación, transformación y purificación (apartados 4.2.3, 4.2.4 y 4.2.7).

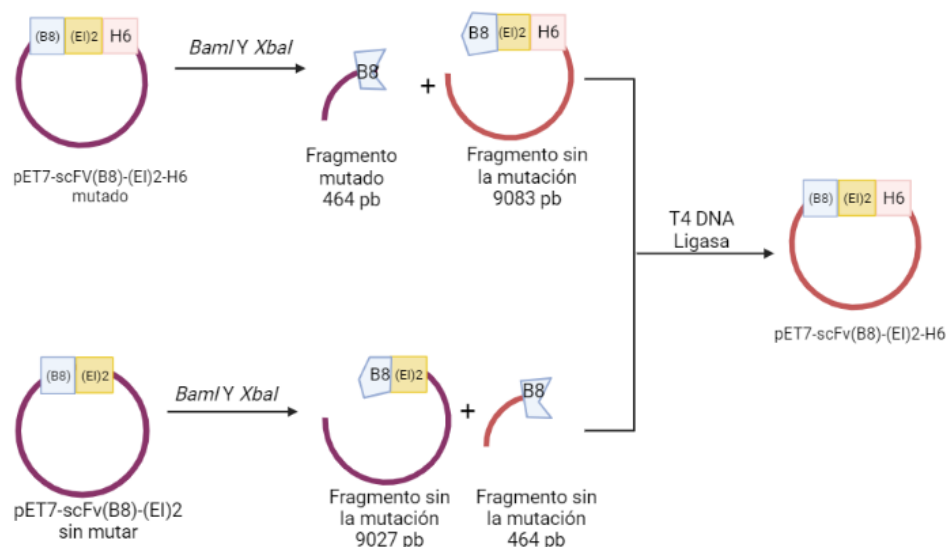


Figura 30: Esquema de síntesis para la corrección del plásmido pET7.scFv(B8)-(EI)2-H6.

5.2.2. Síntesis experimental del plásmido pET7-scFv(B8)-(EI)2-H6 libre de mutación

5.2.2.1. Escisión del inserto scFv(B8)-(EI)2 sin mutar

Para obtener el inserto sin mutar, se realiza la digestión preparativa del plásmido pET7-scFv(B8)-(EI)2 con dos enzimas (Figura 30). En primer lugar, se realiza la linealización con la endonucleasa *BamI*, a continuación, se hace una segunda digestión con el enzima *XbaI*, esta genera dos fragmentos, uno de 9086 pb y otro de 464 pb, este último es el inserto que se emplea para eliminar la mutación. Se comprueba que la digestión se ha producido adecuadamente con una electroforesis analítica, a continuación, se realiza una electroforesis preparativa en gel de agarosa 0,75% , y se lleva a cabo la escisión del fragmento sin la mutación (Figura 31).

Una vez se escinde la banda correspondiente al fragmento sin mutar, se realiza su purificación siguiendo el protocolo PureLink Quick Gel Extraction (apartado 4.2.9). Midiendo la concentración del inserto con el espectrofotómetro NanoDrop One se obtiene un valor de 3 ng/ μ L.

5.2.2.2. Obtención del plásmido pET7-scFv(B8)-(EI)2-H6 sin el fragmento mutado.

Es necesario escindir la mutación del plásmido pET7-scFv(B8)-(EI)2-H6. Para ello se realiza exactamente la misma digestión que en el apartado anterior con los enzimas *BamI* y *XbaI* (Figura 30), pero en este caso el fragmento de interés es el de 9083 pb, mientras que en el fragmento de 464 pb contiene la

mutación. Tras realizar la correspondiente digestión analítica para comprobar que la digestión ha sido correcta, se realiza la electroforesis preparativa en gel de agarosa 0,75% y se escinde la banda correspondiente a 9083 pb (Figura 31)

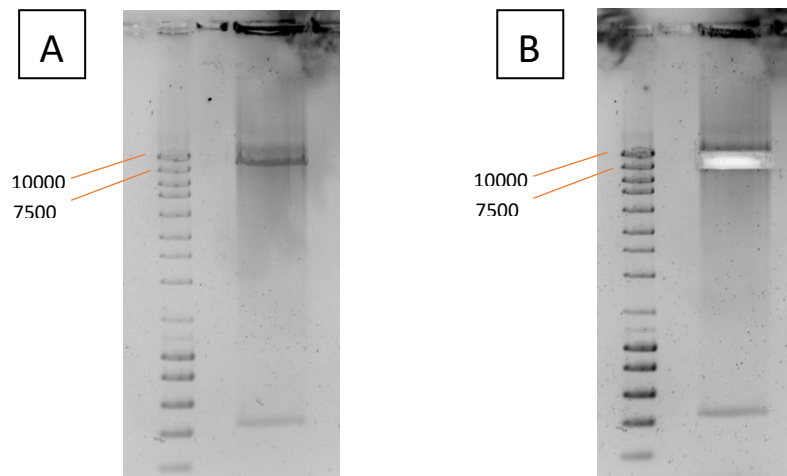


Figura 31: Electroforesis en gel de agarosa 0,75% de la digestión preparativa del plásmido pET7-scFv(B8)-(EI)2-H6 con los enzimas BamI y XbaI antes (Plano A) y después (plano B) de escindir la banda.

En la Figura 31 se puede ver en el Panel A la banda que corresponde con el plásmido pET7-scFv(B8)-(EI)2-H6 con el fragmento que contiene la mutación escindida, en el panel B se puede ver el recorte de toda la banda que contiene el plásmido.

Por último, se purifica el plásmido siguiendo el protocolo PureLink Quick Gel Extraction y se mide su concentración, siendo 4,6 ng/ μ L.

5.2.2.3. Clonación del plásmido pET7-scFv(B8)-(EI)2-H6 libre de mutación

Siguiendo el esquema de la Figura 30, una vez se tiene el plásmido sin la mutación de 9083 pb y el fragmento sin la mutación de 464 pb, ambos purificados, se lleva a cabo la clonación (apartado 4.2.3) para obtener el plásmido pET7-scFv(B8)-(EI)2-H6 libre de mutación.

El plásmido pET7-scFv(B8)-(EI)2-H6 obtenido se emplea en la transformación de células competentes NZY5 α (apartado 4.2.4) y se realiza el posterior cultivo de las células en medio LB-Ampicilina. Por último, se purifica el DNA plasmídico según el protocolo NucleoSpin[®] Plasmid/Plasmid Nolid (apartado 4.2.7.1.1). Para comprobar que la clonación y transformación se han llevado a cabo de forma satisfactoria, se realiza por un lado la digestión con la endonucleasa XbaI que debería generar un único fragmento de 9623 pb y por otra la digestión con los enzimas XbaI y HindIII, debiéndose generar los fragmentos dos fragmentos; uno de 5393 pb que únicamente contiene el vector de expresión y otro fragmento de 4230 p donde se encuentra el gen de interés scFv(B8)-(EI)2-H6, es el mismo proceso que el descrito en el apartado 5.1.2.2.1 (Figura 32)

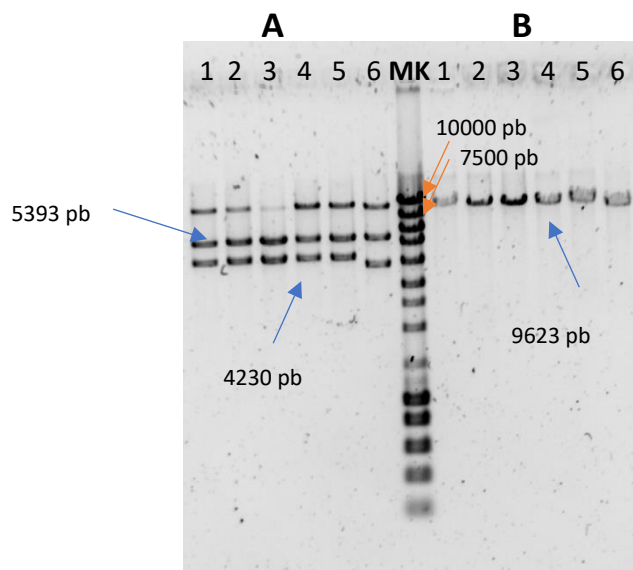


Figura 32: Panel A: digestión analítica de las colonias 1-6 del plásmido pET7-scFv8b89-(EI)2-H6 con los enzimas XbaI y HindIII. Panel B: digestión analítica de las colonias 1-6 del plásmido con el enzima XbaI. En la calle MK se muestra el marcador NZYLadderIII

En la Figura 32 se puede ver que, en todas las colonias, a excepción de la colonia 6 que tiene una banda de peso molecular inferior al esperado, se ha producido correctamente la clonación. En el Panel A que muestra la digestión con los enzimas XbaI y HindIII se observan tres bandas debido a que las digestiones han sido parciales, es decir no se ha digerido completamente el plásmido, por ello observamos una banda adicional a 9623 pb que corresponde al plásmido únicamente digerido con XbaI.

Se decide trabajar con la colonia 3 ya que es la que mejor se ha digerido, así se mide la concentración en NanoDrop One, siendo de 272,4 ng/ μ L. Por último, la colonia 3 del plásmido pET7-scFv(B8)-(EI)2-H6 es analizada por secuenciación automática de DNA (apartado 4.2.11), se comprueba que la secuencia de nucleótidos que compone el fragmento B8-(EI)2-H6 es correcta y que se encuentra en el marco de lectura adecuado.

3. BIOPRODUCCIÓN DEL POLÍMERO RECOMBINANTE TIPO ELASTINA (B8)-(EI)2-H6

En este trabajo se lleva a cabo la bioproducción del recombinámero (B8)-(EI)2-H6, con un peso molecular teórico de 117885,75 Da. Con el empleo de diferentes técnicas este polímero recombinante tipo elastina posteriormente se purifica y caracteriza.

En esta etapa se busca que la traducción y expresión de los genes sea elevada, es decir, conseguir la mayor producción posible del polímero recombinante. Para lo cual, se realiza una transformación de la colonia 3 del plásmido pET7-scFv(B8)-(E1)2-H6 en células BLR (DE3) *Competents Cells* (apartado 4.2.4), y las colonias obtenidas en la transformación se aíslan en una placa Petri. A continuación, mediante un Screening utilizando una θ electroforesis analítica SDS-PAGE de proteínas (apartado 0) se determina que colonia bacteriana aislada es la más productora. Es decir, que colonia es capaz de generar una mayor cantidad de ELR. Para facilitar el reconocimiento en el gel de electroforesis de la banda del gen de interés, se emplea un control negativo que únicamente está formado por las células BLR sin transfectar. Así, las colonias transformadas presentan las mismas bandas que el control y una adicional que será el gen.

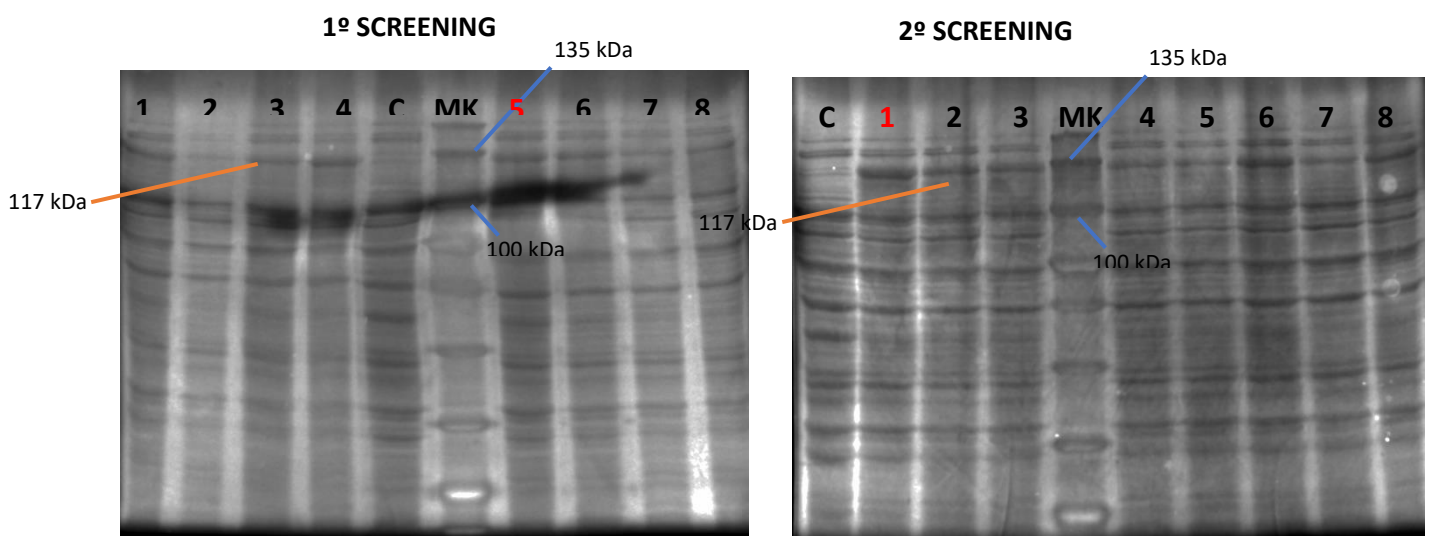


Figura 33: Electroforesis SDS-PAGE de los screenings realizados para la posterior producción del gen B8(E1)2H6. En ambos Screening se pueden diferenciar las calles: C: control negativo; MK: protein marker; Calles 1-8: colonias sembradas. En color rojo se seleccionan la colonia más productora en cada caso

En la Figura 33 que muestra el primer screening realizado se diferencia la banda correspondiente al recombinámero scFv(B8)-(E1)2-H6 (banda marcada con una línea naranja) del resto de bandas propias de las bacterias. Las proteínas propias de la bacteria tienen un nivel de producción semejante, mientras que las proteínas del ELR presentan diferentes niveles de producción. Con este screening se decide que la colonia más productora es la cinco. Con esta colonia se realiza un segundo screening (se ha comprobado que de este modo la producción del polímero recombinante incrementa). Según la Figura 33 que muestra el segundo screening se aprecia que la colonia más productora es la 1. Así a partir de esta colonia se continúa con la correspondiente producción del ELR.

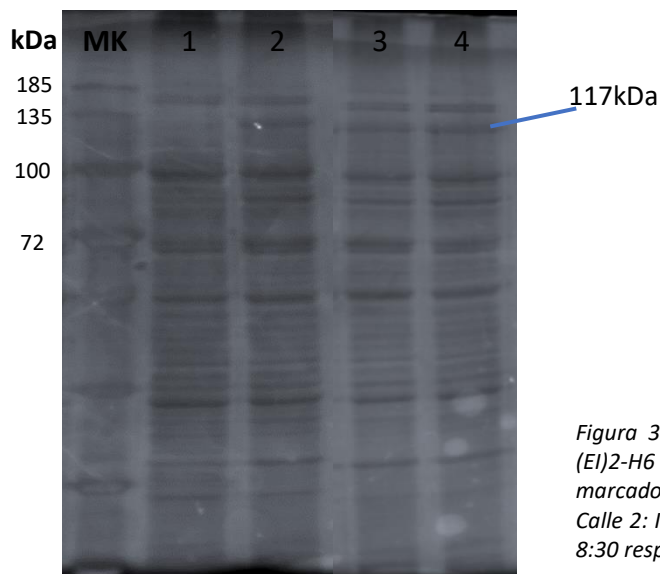
Antes de detener el crecimiento bacteriano se miden las absorbancias a 600 nm del control, inóculo y de las muestras tomadas a diferentes horas. Estos datos se recogen en la *Tabla 6*.

Tabla 6: Valores de las absorbancias de los parámetros medidos durante la bioproducción en Flask

MUESTRA	$A_{600nm} \times 10$	DILUCIÓN (v:v)
Control	3,62	1:10
Inóculo	2,97	1:10
8:00h (t_0)	1,68	1:10
8:30h (t_{30})	1,66	1:10

Al observar que los valores de las absorbancias medidas con media hora de diferencia se mantenían prácticamente constantes, se para la producción y con ello la fase de crecimiento estacionario de las células.

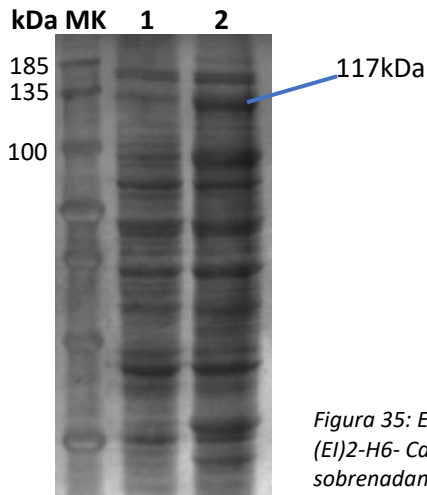
Con las muestras tomadas se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para comprobar que la bioproducción del polímero ha sido correcta (Figura 34).



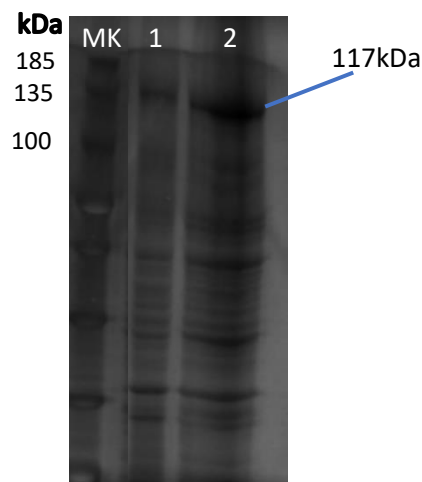
Una vez se comprueba que el polímero se ha producido adecuadamente, se procede a realizar el lavado y ruptura de las células mediante sonicación (apartado 4.2.15). Una vez se realiza este proceso, se puede pasar a la purificación del polímero.

4. PURIFICACIÓN DEL POLÍMERO RECOMBINANTE B8(EI)2H6

El lisado celular se somete a centrifugación y para poder diferenciar si el polímero aislado se encuentra en el sobrenadante o el precipitado que surge de la centrifugación, se realiza una electroforesis SDS-PAGE (apartado 0). En la Figura 35 se muestra el gel de electroforesis y puede ver como la mayor parte del recombinámero (117 KDa) se encuentra en el pellet obtenido tras la sonicación y centrifugación.



Para realizar la purificación del recombinámero cuando se encuentra en el pellet, es necesario resuspender una disolución acuosa del mismo en sales de Guanidina 3M para desnaturalizar todas las proteínas (apartado 4.5). Esta mezcla se centrifuga y se obtiene un pellet y un sobrenadante, de nuevo se realiza una electroforesis SDS-PAGE para comprobar dónde se encuentra nuestro ELR, de este modo, en la Figura 36 se puede ver como en este caso el polímero permanece en el sobrenadante, tal y como se esperaba.



La purificación del ELR contenido en el sobrenadante se realiza haciéndolo pasar por una columna de afinidad y aprovechando las propiedades de la cola de histidinas que tiene el polímero recombinante (apartado 4.5). En este paso se realiza un gradiente de sales de Guanidina de 3M a 0M favoreciendo la formación de los puentes disulfuro y con ello el progresivo y correcto plegamiento de la proteína. De este modo, se pasa el sobrenadante obtenido por la columna de afinidad y se obtienen diferentes fracciones. Analizando el cromatograma obtenido (Figura 37) se puede ver como los tubos que muestran un pico de absorbancia a 280nm son lo que contienen el recombinámero B8-(EI)2-H6.

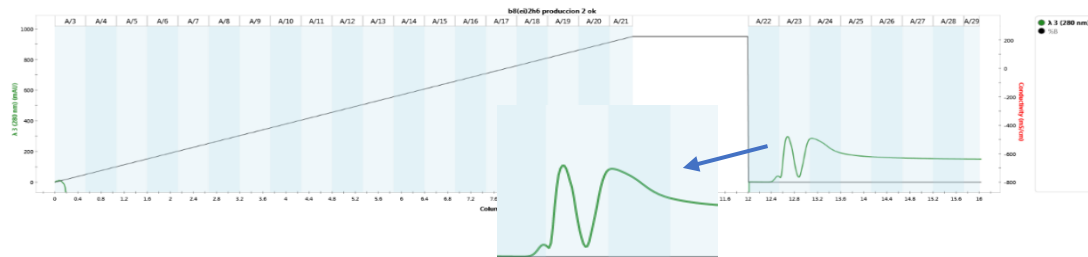


Figura 37: Cromatograma obtenido en la purificación de B8(EI)2H6 por cromatografía en columna de afinidad (Thermo Scientific HisPur™ Ni-NTA Resin). Se emplea el cromatograma NGC Quest System (BioRad®). Se resalta la zona en la que se detecta la elución del polímero a 280nm.

Se realiza una electroforesis SDS-PAGE para confirmar que las fracciones en las que, según el cromatograma, se encuentra nuestro polímero son correctas. En la Figura 38 se observa como el polímero sólo se encuentra en la fracción 23, es la única en la que se distingue la banda característica a 117 kDa que corresponde al polímero B8(EI)2H6. Además de la banda correspondiente al polímero se pueden observar otras bandas inferiores que podrían corresponder a los productos de degradación. Si se tiene en cuenta que la intensidad de la banda es proporcional a la cantidad de proteína que se encuentra en disolución, se puede interpretar que la cantidad de polímero de interés es bastante superior a la cantidad de los productos de degradación.

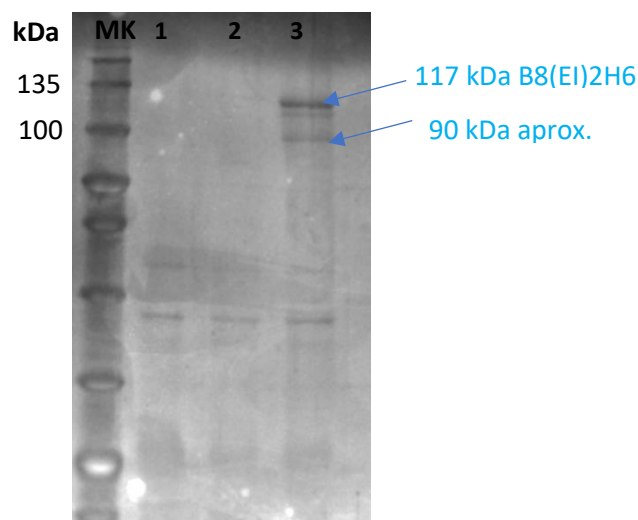


Figura 38: Electroforesis SDS-PAGE de las fracciones obtenidas de la purificación en las que se sospecha que puede estar el polímero B8(EI)2H6. En las calles se observa: MK, marcador de proteínas NXY-Bluesafe; Calles 1-3, se observan las fracciones 21, 22 y 23 obtenidas en la columna de afinidad. Tinción con CuCl2

Para finalizar el proceso de purificación se realiza una diálisis que permite eliminar los restos de sales e imidazol empleados en el proceso anterior. Por último, la disolución que se obtiene se liofiliza consiguiendo el polímero puro y seco (apartado 4.2.16).

El peso del polímero B8(EI)2H6 obtenido fue 6,2 mg. Se obtiene un rendimiento de 1,55 mg/L de producto purificado.

5. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL POLÍMERO B8(EI)2H6:

5.5.1. Espectrometría de masas: MALDI-TOF

En la Figura 39 se puede observar el espectro obtenido mediante espectrometría de masas para el polímero B8(EI)2H6. Se debería de observar un pico en torno a 117 Kilodalton. Sin embargo, se puede ver un pico que aparece a 89635 Dalton y que realmente corresponde con el ion molecular del polímero (EI)₂, por lo tanto, gracias a esta técnica se observa claramente que el polímero se ha degradado. El pico que aparece a 44842 Dalton corresponde a la segunda ionización.

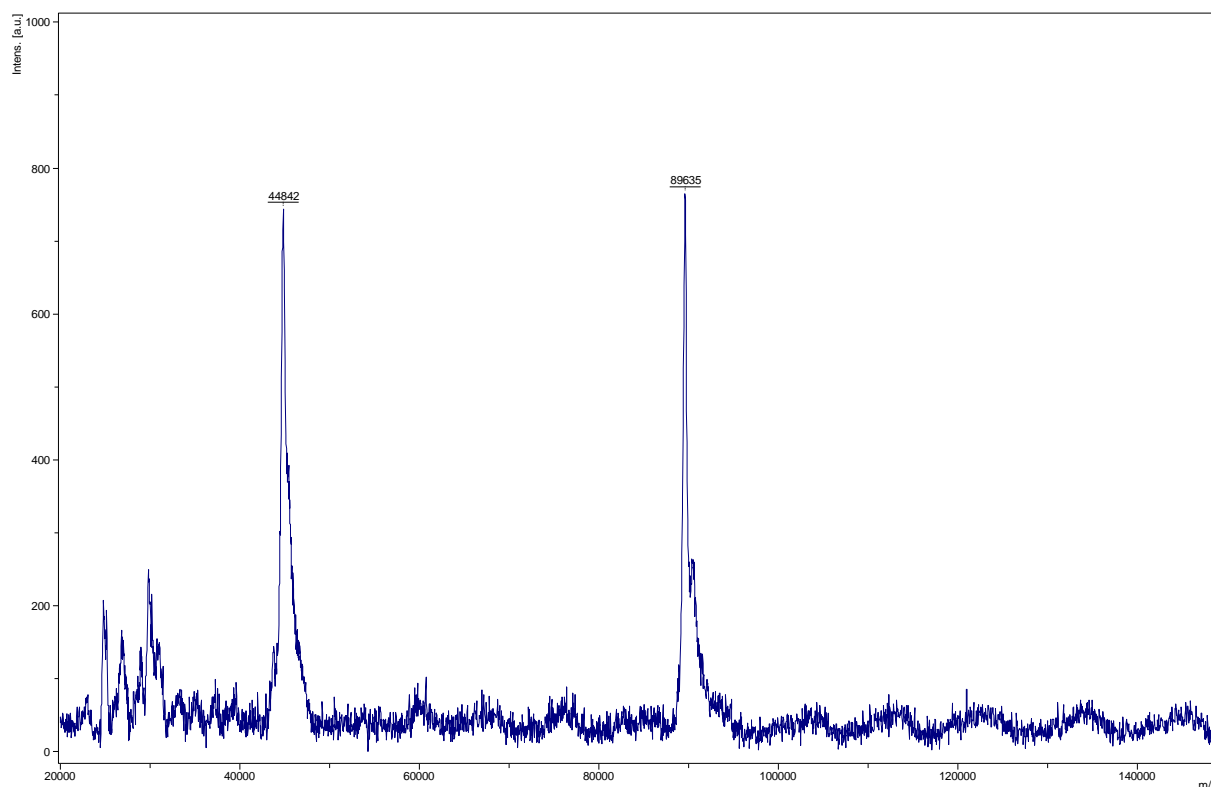


Figura 39: Espectro de Masas del polímero B8(EI)2H6 llevado a cabo en un espectrómetro MALDI-TOF (matriz 2,5 DHAP) en agua

Observando las electroforesis realizadas en la bioproducción, aunque aparentemente el polímero es mayoritario con respecto al producto de degradación, con esta técnica se puede ver que únicamente se ha obtenido el polímero degradado. Se puede determinar que la degradación ocurre después de la purificación se cree que es en la etapa de dialización ya que por problemas técnicos la diálisis se realizó

a 17°C en lugar de 4°C, de tal forma que el incremento de la temperatura podría haber favorecido la actividad de alguna proteasa bacteriana no eliminada en la purificación.

5.5.2. Espectroscopía DSL

Esta técnica se ha empleado con el objetivo de determinar la temperatura de transición del polímero sintetizado, scFv(B8)-(E1)2-H6, así como su comparación con el polímero (E1)2 para poder determinar si realmente presentan el mismo comportamiento, ya que la parte elastomérica y por tanto termoesponsiva que tiene es igual.

En un primer lugar se trabaja con una disolución del polímero scFv(B8)-(E1)2-H6 a 4°C, está se introduce en el equipo y se va analizando su comportamiento a medida que aumenta la temperatura. De este modo se obtiene la gráfica (Figura 40).

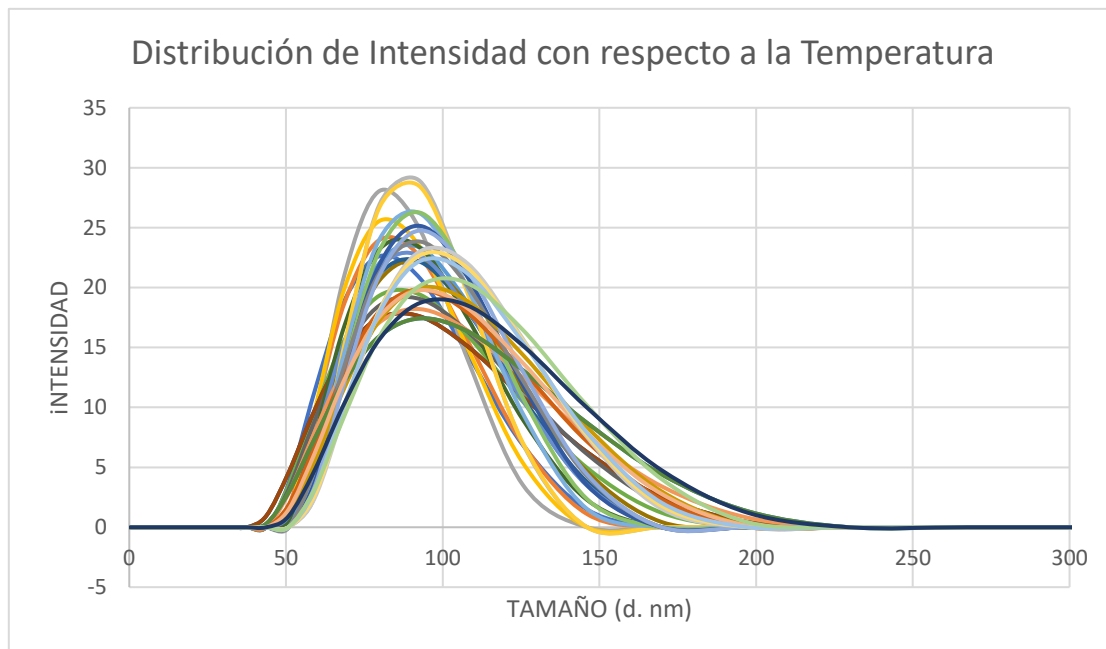


Figura 40: Gráfico del comportamiento del polímero scFv(B8)-(E1)2-H6 con respecto a la variación de temperatura de 4°C hasta 42°C según los datos obtenidos en el equipo DLS.

En la Figura 40 se puede observar cómo a 4°C el polímero ofrece una señal en torno a 100 nm que se mantiene constante a lo largo del gradiente de temperaturas aplicado, lo cual indica que a 4°C el polímero ya está agregado. Si el polímero no hubiese estado agregado, a 4°C debería visualizarse un tamaño de alrededor de 10-20 nm, lo que indicaría que las moléculas se encuentran desplegadas y separadas.

Por otro lado, gracias a estudios anteriores, se conoce que el polímero (E1)2 forma partículas de alrededor de 50 nm por encima de su temperatura de transición. Este valor difiere mucho de los 100 nm que presenta nuestro polímero, lo cual hace pensar que el polímero sintetizado podría no estar

totalmente degradado y mantenerse un pequeño porcentaje de polímero con scFv que da lugar a partículas de un tamaño mayor.

Teniendo en cuenta que sí que hay algo de scFv en el polímero, se realizan seis mezclas con las disoluciones de (EI)2 y el polímero scFv(B8)-(EI)2-H6 variando la relación molar (90:10, 72:25, 66:33, 50:50, 33:66, 25:75 respectivamente) para ver si alguna de ellas presenta partículas más estables. Se analiza el comportamiento de cada una de ellas a 4°C y a 37°C. Así, se obtienen los siguientes gráficos (Figura 41 y Figura 42)

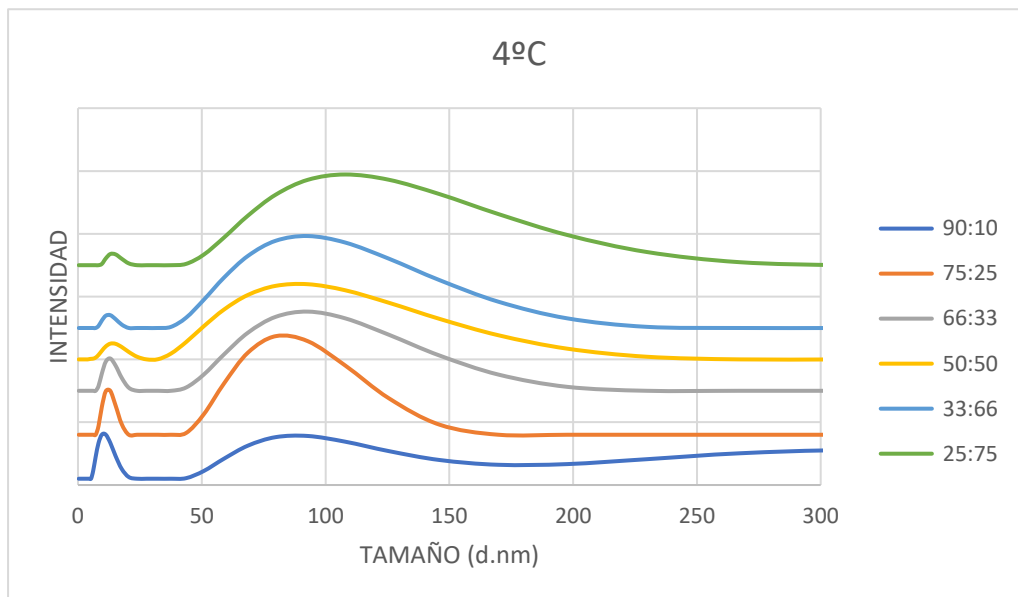


Figura 42: Gráfico obtenido en el equipo DSL que muestra el comportamiento de las disoluciones preparadas mezclando los polímeros (EI)2 y scFv(B8)(EI)2(H6) a distintas proporciones y temperatura constante de 4°C.

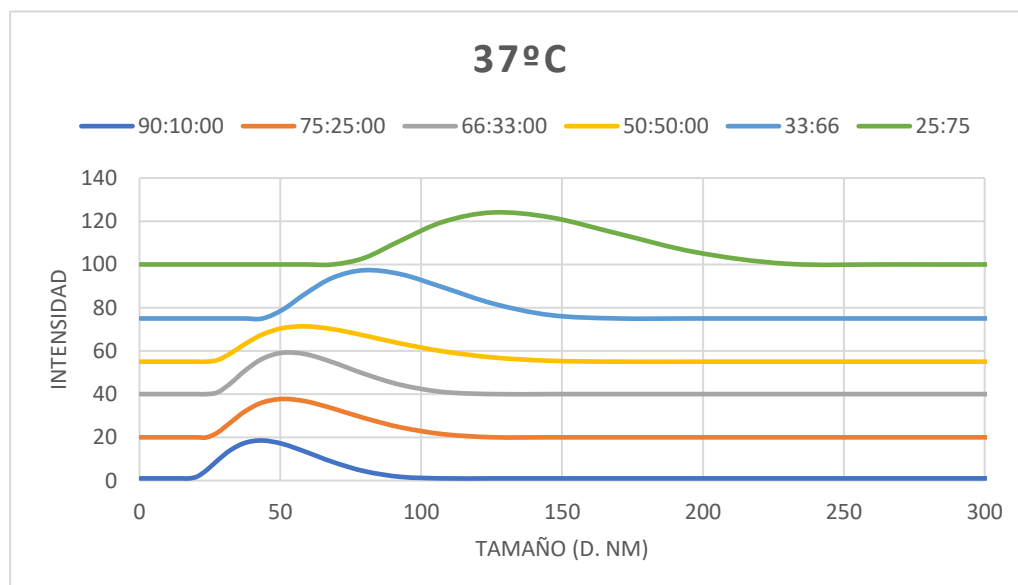


Figura 41: Gráfico obtenido en el equipo DSL que muestra el comportamiento de las disoluciones preparadas mezclando los polímeros (EI)2 y scFv(B8)(EI)2(H6) a distintas proporciones y temperatura constante de 37°C.

En la Figura 42 se muestra el comportamiento a 4°C. En este caso se puede ver como aparecen dos poblaciones totalmente separadas, presentando siempre un pico próximo a 10 nm que corresponde a la molécula de (EI)2 antes de agregarse y un pico próximo a 100 nm que corresponde al polímero objeto de estudio como ya se ha visto anteriormente, Además, se observa como a medida que aumenta la cantidad de polímero scFv(B8)-(EI)2-H6 su señal aumenta, mientras que la señal de (EI)2 pierde intensidad y viceversa.

En la Figura 41 se puede observar cómo se comportan aplicando una temperatura de 37°C, en este caso ambos polímeros han alcanzado la temperatura de transición y se encuentran formando partículas. Sabiendo que las partículas de polímero (EI)2 presentan un tamaño próximo a 50 nm y que el polímero que se estudia es de 100 nm, se puede ver como al aumentar la proporción del polímero (EI)2 el tamaño de la partícula disminuye y se va acercando a 50 nm y viceversa.

5.5.3. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

El espectro obtenido por ¹H-RMN se pueden ver en las Figura 43 y Figura 44, se observa que para el mismo espectro se realizan dos asignaciones diferentes, en la Figura 43 se considera que el espectro corresponde al polímero scFv(B8)(EI)2H6 y en la Figura 44 que corresponde al espectro del (EI)2H6.

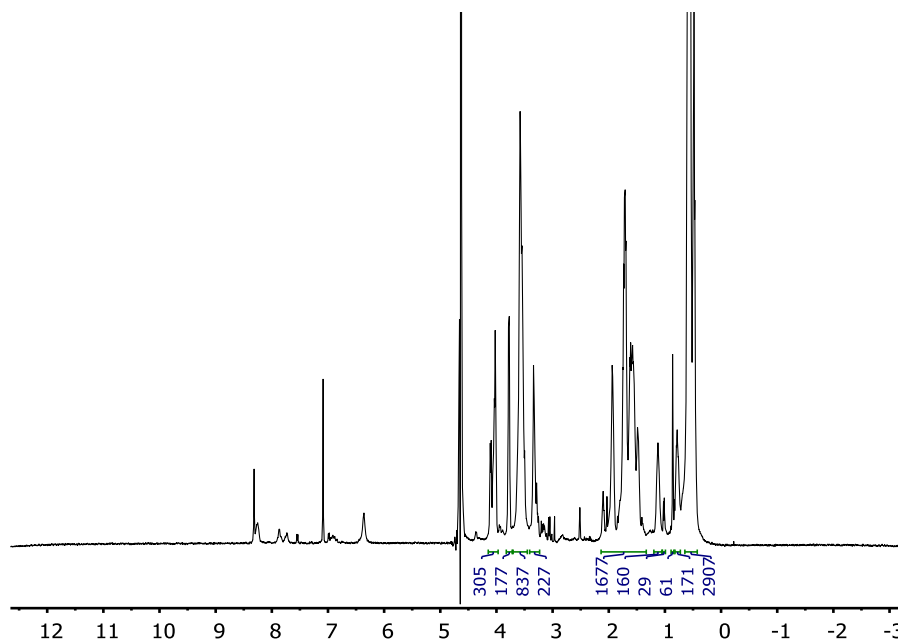


Figura 43: Espectro ¹H-RMN del polímero scFv(B8)(EI)2H6 en espectrómetro de 500Hz. Disolvente usado: D2O.

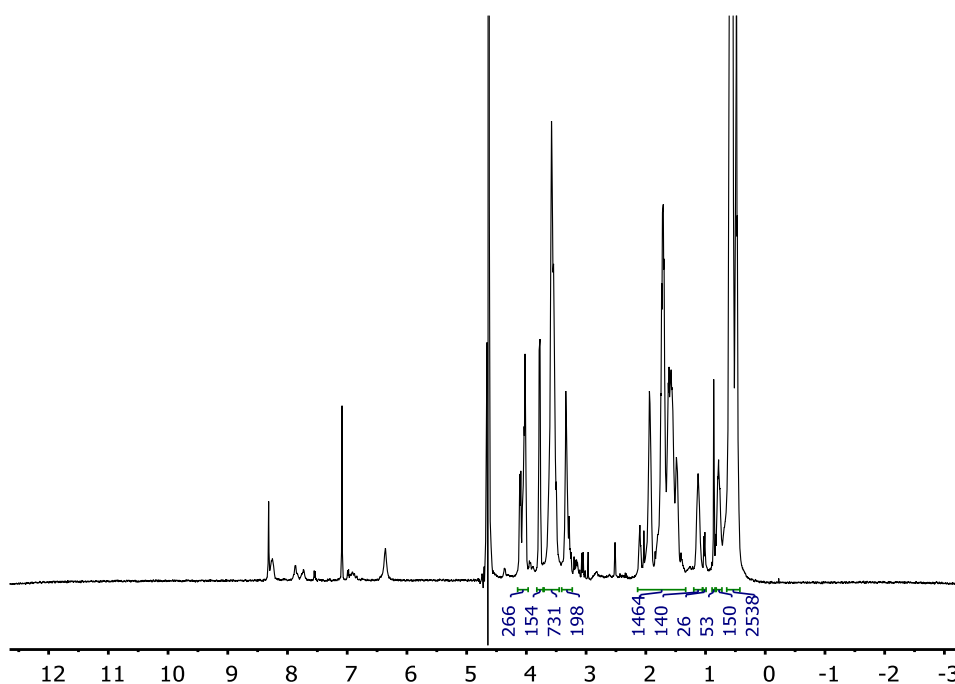


Figura 44: Espectro 1H-RMN del polímero (EI)2H6 en espectrómetro de 500Hz. Disolvente usado: D2O.

En la Tabla 7 se muestran los datos esperados según la predicción obtenida con el software Chemdraw (PerkinElmer®) y los datos experimentales obtenidos para el polímero scFv(B8)(EI)2H6 y para el polímero (EI)2H6.

Tabla 7: Datos esperados y obtenidos para el espectro de RMN de los polímeros scFv(B8)(EI)2H6 y (EI)2H6 en D2O.

POLÍMERO		-H aromáticos	-X-CH ; O=C-H	CH y CH2	CH3
	δ (ppm)	7.0-8.0	3.0-4.2	1.0-2.0	0.0-0.75
(EI)2H6	nº H teórico	12	669	2967	2538
	nº H experim.	-	1349	1833	2538
scFv(B8)(EI)2H6	nº H teórico	115	880	3585	2907
	nº H experim.	-	1546	2098	2907

En los espectros obtenidos se emplea como referencia el número de protones de CH3 (señal entre 0 y 0.75 ppm) para normalizar el resto de las integrales.

Comparando los valores obtenidos en la Tabla 7 para cada polímero, no se puede establecer exactamente que sea uno de los polímeros en su totalidad, es decir, de nuevo se confirma que ha ocurrido una degradación, pero al no conocer la proporción (90:10, 50:50, etc.) a la que se encuentra el scFv con respecto a (EI)2H6 no se puede dar una asignación precisa.

Además, analizando el espectro obtenido y sabiendo que los fragmentos de scFv se caracterizan por poseer aminoácidos con grupos aromáticos, las señales que aparecen en el rango 7-8 ppm, no se pueden analizar con claridad, estas no llegan a descartar del todo que el scFv esté completamente degradado. Por otro lado, se observa un pico muy agudo en 7 ppm que es característico del Imidazol, este se encuentra presente tanto en las Histidinas como en el Tampón de elución empleado en la purificación por columna de afinidad.

Si tenemos en cuenta que ambos polímeros sólo poseen 6 Histidinas, no se puede decir que está señal corresponda únicamente a estas, por lo tanto, la etapa de diálisis no ha sido perfecta y aún se puede apreciar la presencia de Tampón de Elución, de nuevo esto se puede deber al fallo de temperatura con el que se trabajó (se trabajó a 17°C en lugar de a 4°C por fallos en la cámara fría).

Por último, para poder realizar una asignación exacta del espectro obtenido es necesario realizar otro espectro H-RMN bifuncional como podría ser DOSY o HSQC.

6. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL POLÍMERO B8(EI)2H6

5.6.1. ELISA

Como se ha explicado en el apartado 4.2.18.1 la técnica de ELISA permite comprobar si el polímero presenta funcionalidad biológica, detectando el antígeno VEGF al que debería unirse el scFv del biopolímero sintetizado, scFv(B8)-(EI)2-H6.

Se lleva a cabo un único ELISA en el que se emplean las disoluciones madre (5ng/mL) del polímero scFv(B8)-(EI)2-H6 y dos controles negativos, (EI)2 (polímero que tiene la misma estructura, pero sin el scFv) y VOK-H6 (un polímero policatiónico, con una estructura diferente a los otros dos). Trabajando según las condiciones descritas en el apartado 4.2.18.1, variando la concentración de los biopolímeros y realizando su normalización en un parámetro Z (Tabla 8) se obtiene la siguiente gráfica (Figura 45)

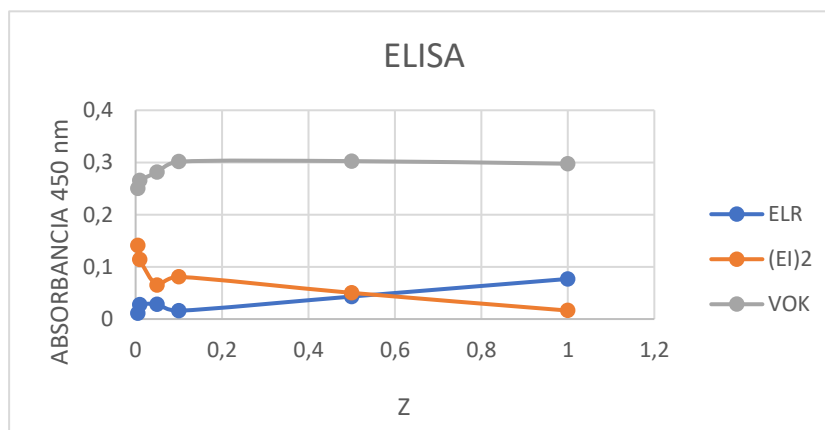


Figura 45: Gráfica del ELISA comparativo del polímero scFv(B8)(EI)2H6 con los controles negativos (EI)2 y VOKH6.

Tabla 8: Datos Figura 46 del ELISA llevado a cabo con el ELR scFv(B8)(EI)2H6. las medidas se realizan por triplicado. Los polímeros son descritos con las concentraciones descritas en la primera celda, pero como se quiere cuantificar el scfv(B8)(EI)2H6 se normalizan los datos de la concentración.

C (ng/μl)	z	Abs B8-(EI)2-H6	Desviación estándar	Abs (EI)2	Desviación estándar	Abs Vok-H6	Desviación estándar
0,015	0,005	0,011	0,008	0,141	0,093	0,25	0,007
0,03	0,01	0,0273	0,019	0,114	0,085	0,265	0,006
0,15	0,05	0,028	0,025	0,065	0,058	0,281	0,026
0,3	0,1	0,016	0,039	0,081	0,038	0,302	0,034
1,5	0,5	0,043	0,050	0,050	0,002	0,303	0,040
3	1	0,077	0,085	0,016	0,015	0,298	0,033

Se puede observar como la señal del polímero scFv(B8)-(EI)2-H6 y la señal correspondiente al control negativo (EI)2 presentan valores similares y muy próximos al cero (en ambos casos los valores son inferiores a 0,1). Así, se establece que, al tener un comportamiento muy parecido, realmente el polímero scFv(B8)-(EI)2-H6 está degradado comportándose como (EI)2-H6.

Por otro lado, se observa que el control negativo VOK-H6 proporciona una señal muy grande, esto es a causa de las interacciones inespecíficas al tratarse de un polímero policatiónico, ya que realmente no debería de dar señal.

6. CONCLUSIONES

1. Se ha diseñado el polímero recombinante tipo elastina (ELR) denominado scFv(B8)-(E1)2-H6 constituido por tres bloques: el scFv(B8), que le da especificidad de unión al factor de crecimiento endotelial vascular 165, el tetrabloque (E1)2 con alternancia de secuencias hidrofóbicas e hidrofílicas y el bloque H6 de lisinas que permite la purificación del polímero. Este diseño le confiere la propiedad de servir como un nanodispositivo para la liberación de fármacos dirigidos a los tejidos endoteliales vasculares.
2. Empleando técnicas de Ingeniería Genética se ha clonado el gen scFv(B8)-(E1)2-H6 con el vector pET7 para poder realizar una posterior bioproducción del polímero recombinante tipo elastina scFv(B8)-(E1)2-H6.
3. Al analizar la secuencia del polímero recombinante tipo elastina scFv(B8)-(E1)2-H6 obtenido tras este primer ensayo de clonación y bioproducción se observa que ha sufrido una mutación.
4. Se ha diseñado una estrategia para eliminar la mutación que consistió en un clonaje alternativo, fusionando dos bloques génicos libres de mutación con una clonación convencional (no seamless) eso ha sido posible debido a que las extremidades obtenidas con las enzimas de tipo II utilizadas no cambiaban el marco de lectura y no introducían cambios en la secuencia de aminoácidos .
5. Se ha logrado la clonación del scFv(B8)-(E1)2-H6 libre de mutación en el vector pET7 y la posterior transformación de células competentes BLR que se cultivan para la expresión del ELR.
6. Se realiza una serie de análisis de expresión para poder seleccionar la colonia bacteriana más productora del ELR scFv(b8)(E1)2H6, es decir, la que produce una mayor cantidad del polímero. Seleccionada la colonia, se lleva a cabo un cultivo de 4L, distribuidos en 10 matraces de 2 L, que permite escalar la producción del ELR. Para realizar la producción se lleva un control exhaustivo de los parámetros que lo regían, sin embargo, los resultados obtenidos tras la bioproducción del ELR no son tan buenos como los obtenidos por otros ELRs de peso molecular parecidos.
7. Para purificar el polímero B8(E1)2H6 se emplea una columna de afinidad que contiene una resina que fija la cola de histidinas. Este proceso es imprescindible para conseguir que la proteína se pliegue correctamente y adopte su conformación nativa debido a que no la consigue durante la producción bacteriana.

8. Se analizan los resultados obtenidos de la purificación con una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), se observa la banda del polímero scFv(B8)(E1)2H6 de 117 KDa, pero a su vez se ven bandas que pueden representar productos de degradación.
9. El rendimiento obtenido tras las etapas de bioproducción y purificación de scFv(B8)(E1)2H6 fue de 1,55 mg/L.
10. Se realiza una caracterización físico-química del polímero mediante las siguientes técnicas: electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), espectrometría de masas (MALDI-TOF), dispersión dinámica de la luz (DSL), resonancia magnética nuclear (RMN)
11. Se realiza una caracterización funcional del polímero con la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

7. PERSPECTIVAS DE FUTURO

En primer lugar, es imprescindible llevar a cabo una optimización del proceso de producción y purificación del polímero para obtener una mayor producción, e identificar y neutralizar la proteasa que pueda degradar el polímero tras realizar ambos procesos. Además, se podría estudiar el uso de otras cepas bacterianas que no contengan las proteasas que podrían ser las responsables de la degradación del polímero.

Otra alternativa sería identificar y sustituir el conjunto de aminoácidos del fragmento scFv que presentan una elevada afinidad por la proteasa que degrada el polímero recombinante por otros aminoácidos que no la presenten. También sería importante tener en cuenta que la diálisis se debe de hacer a 4°C en lugar de a 17°C, de este modo se reduce la actividad de las proteasas.

Se espera de trabajos futuros con el polímero B8(E1)2H6, codificado a partir del plásmido recombinante generado en este trabajo, determinar su funcionalidad como terapia dirigida específicamente al tratamiento de enfermedades oculares como la degeneración macular.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Desmond S.Y. Nicholl. An Introduction To Genetic Engineering, 3rd Edition
2. Benjamin Lewin. GENE Genes XI . Capitulo 3.
3. Crick F. Central Dogma of Molecular Biology. Vol. 227, NATURE. 1970.
4. Gómez-Márquez J. La Revolución de la Ingeniería Genética. Nova Acta Científica Compostelana (Biología). 2013. Pg 13–21.
5. Hassan M, Naz A, Siddique A, Shahzadi S, Din S ud, Yaseen Z, et al. Synthetic biology in healthcare: technologies and applications. Biotechnology in Healthcare, Volume 1. 2022 Jan. pg 41–53.
6. Hollinger JO. An Introduction to Biomaterials, Second Edition. CRC Press; 2011. pg 634.
7. Wagner WR, Sakiyama-Elbert S, Zhang G, Yaszemski MJ. Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine [Internet]. Journal of Clinical Engineering. Elsevier; 2020 [cited 2022 Jul 14]. 1651 p. Available from: <https://www.elsevier.com/books/biomaterials-science/wagner/978-0-12-816137-1>
8. Salazar Montes Adriana, Sandoval Rodríguez Ana, Armendáriz Borunda Juan. Biología molecular : fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. McGraw-Hill Interamericana; 2013.
9. Real Academia Nacional de Medicina: Buscador [Internet]. [cited 2022 Jul 4]. Available from: http://dtme.ranm.es/buscador.aspx?NIVEL_BUS=3&LEMA_BUS=elastina
10. Gray WR, SANDBERG LB, FOSTER JA. Molecular model for elastin structure and function. 1973.
11. Debelle L, Tamburro AM. Elastin: molecular description and function. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 1999 Feb. pg 261–72.
12. Rodgers UR, Weiss AS. Cellular interactions with elastin. Pathologie Biologie. 2005 Sep. pg 390–398.
13. Gosline JM. Biopolymers: Original Research on Biomolecules. 1978. Pg 677–695.
14. Reiersen H, Clarke AR, Rees AR. Short elastin-like peptides exhibit the same temperature-induced structural transitions as elastin polymers: implications for protein engineering. J Mol Biol [Internet]. 1998 Oct 16 [cited 2022 Jul 4];283(1):255–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9761688/>
15. A. Fernández-Colino, A. Girotti, M.I. López, F.J. Arias, J.C. Rodríguez-Cabello. Los polímeros tipo elastina y su utilización como tags para la purificación de proteínas. Vol. 19, Biomateriales. 2011. Pg 8-16.
16. Urry DW. Entropic Elastic Processes in Protein Mechanisms. I. Elastic Structure Due to an Inverse Temperature Transition and Elasticity Due to Internal Chain Dynamics. Journal of Protein Chemistry. 1988;7(1).

17. A. Fernández-Colino, A. Girotti, M.I. López, F.J. Arias, J.C. Rodríguez-Cabello. Los polímeros tipo elastina y su utilización como tags para la purificación de proteínas. Vol. 19, Biomateriales. 2011. pg 8-16.
18. J.C. Rodríguez-Cabello AGARFJA. Methods Mol. Biol. (vol. 811).2012. pg 17-38.
19. An Bergueiro J, Calder M. Thermo-responsive Nanodevices in Biomedical Applications. Available from: www.mbs-journal.de
20. Daamen WF, Veerkamp JH, van Hest JCM, van Kuppevelt TH. Elastin as a biomaterial for tissue engineering. Vol. 28, Biomaterials. 2007. pg 4378–4398.
21. Saha S, Banskota S, Roberts S, Kirmani N, Chilkoti A. Engineering the Architecture of Elastin-Like Polypeptides: From Unimers to Hierarchical Self-Assembly. Adv Ther (Weinh). 2020.
22. Quintanilla-Sierra L, García-Arévalo C, Rodríguez-Cabello JC. Self-assembly in elastin-like recombinamers: a mechanism to mimic natural complexity. Materials Today Bio. 2019 Mar.
23. Mcdaniel JR, Macewan SR, Li X, Radford DC, Landon CD, Dewhurst M, et al. Rational Design of “Heat Seeking” Drug Loaded Polypeptide Nanoparticles That Thermally Target Solid Tumors. 2014; Available from: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
24. Anticuerpo: MedlinePlus enciclopedia médica [Internet]. [cited 2022 Jul 4]. Available from: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/002223.htm>
25. Glockshuber R, Malia M, Pfitzinger I, Plückthun A. A Comparison of Strategies To Stabilize Immunoglobulin Fv-Fragments. Biochemistry. 1990 Feb. pg 1362–1367.
26. Ahmad ZA, Yeap SK, Ali AM, Ho WY, Banu N, Alitheen M, et al. Review Article scFv Antibody: Principles and Clinical Application. Clinical and Developmental Immunology. 2012.
27. A. Ribeiro. Functionality development in systems based on Elastin-like recombinamers: From nano-objects to macrogels, PhD Thesis; 2008.
28. A. Girotti. ; Desarrollo de una plataforma biotecnológica para la obtención de polímeros recombinantes tipo elastina, PhD Thesis; 2007.
29. Laemmli U K. Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. 1970.
30. Nelson AL. mAbs Antibody fragments Hope and hype mAbs 77 Point of View. 2010 [cited 2022 Jul 4];2(1):77–83. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kmab20www.landesbioscience.comwww.landesbioscience.com/journals/mabs/article/10786>
31. Salazar Montes Adriana, Sandoval Rodríguez Ana, Armendáriz Borunda Juan. Biología molecular : fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. McGraw-Hill Interamericana; 2013.

32. Costa ÂMA, Santos AO, Sousa J, Rodrigues JL, Gudiña EJ, Silvério SC, et al. Improved method for the extraction of high-quality DNA from lignocellulosic compost samples for metagenomic studies. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2021 Dec. pg 8881–8893.

9. ABREVIATURAS

ABREVIATURA	NOMBRE COPLETO
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ELP	Polímeros tipo elastina
ELR	Polímeros recombinantes tipo elastina
MilliQ	Agua ultrapura desionizada
scFv	single chain variable fragment Anticuerpo de única cadena
T _t	Temperatura de Transición
pDA	pDriveAll
(VPGVG)	Pentapéptido VPGVG
VEGF	Factor de crecimiento endotelial-vascular
TEMED	Tetrametiletilendiamina
PSA	Persulfato amónico
SDS	Dodecilsulfato sódico
TAE	Tris-ácido acético-EDTA
SAP	Fosfatasa alcalina de camarón

[cfu]	Unidad formadora de colonias
Rf	Factor de retraso
LB	Lysogeny Broth
TB	Terrific Broth
S.O.C	Super Optimal Broth
FastAP	Fosfatasa alcalina termosensible
[pb]	Pares de bases
SPE	Extracción en fase sólida
[Da]	Dalton

Código de Representación de las Bases Nitrogenadas

BASE NITROGENADA	ABREVIATURA
Adenina	A
Timina	T
Guanosina	G
Citosina	C
Uracilo	U

Código de Representación de Aminoácidos

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