



---

# Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Máster en Técnicas Avanzadas en Química.

Análisis y Control de Calidad Químicos.

## **Biosíntesis y caracterización de biopolímeros recombinantes para aplicaciones biomédicas**

Autor/a: Estela Aparicio Peñacoba

Tutor/es/as: Francisco Javier Arias y Alessandra Girotti

2022/2023

## **AGRADECIMIENTOS**

Con este apartado quiero agradecer a todas aquellas personas que me han ayudado y apoyado a lo largo de toda la realización del presente trabajo de investigación.

En primer lugar a mi familia y amigos por apoyarme tanto en los buenos como en los malos momentos, acompañándome en todo momento y viéndome crecer, tanto personal como profesionalmente.

En segundo lugar, a mi compañero Jonathan, por llevarme en todo momento de la mano y ayudarme durante todo el trayecto.

Por último, a mis tutores Javier y Alessandra, por la ayuda recibida en la realización del presente trabajo.

Además, agradecer al equipo de Procereal, RMN y DLS del LTI por prestarnos sus equipos para poder realizar el trabajo.

Todo esfuerzo tiene su recompensa, y esta es la mía.

## ÍNDICE

1. RESUMEN .....	5
2. INTRODUCCIÓN.....	6
2.1. PROTEÍNAS.....	6
2.1.1. Elastina .....	7
2.1.2. Polímeros tipo elastina (ELP).....	8
2.2. POLÍMERO (KI) <sub>2</sub> .....	10
2.3. POLÍMERO (EI) <sub>2</sub> .....	11
3. OBJETIVOS.....	13
4. MATERIALES Y MÉTODOS. ....	14
4.1. MATERIALES.....	14
4.1.1. Reactivos químicos .....	14
4.1.2. Disoluciones tamponadas .....	14
4.1.3. Cepa bacteriana.....	15
4.1.4. Medios de cultivo y suplementos .....	15
4.2. MÉTODOS. ....	16
4.2.1. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida .....	16
4.2.2. Selección de la colonia más productora (Screening) .....	17
4.2.3. Producción de biopolímeros recombinantes. <sup>11</sup> .....	18
4.2.4. Purificación de biopolímeros recombinantes. ....	20
4.2.5. Cromatografía de exclusión por tamaños .....	22
4.2.6. Caracterización biopolímeros recombinantes. ....	22
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ....	24
5.1. Producción del biopolímero recombinante (KI) <sub>2</sub> .....	24

5.2.	Purificación del biopolímero recombinante (KI) <sub>2</sub> .....	28
5.3.	Producción del biopolímero recombinante (EI) <sub>2</sub> .....	33
5.4.	Purificación de biopolímero recombinante (EI) <sub>2</sub> .....	35
5.5.	Caracterización del biopolímero recombinante (EI) <sub>2</sub> .....	38
5.5.1.	Espectrometría de masas (MALDI-TOF).....	38
5.5.2.	Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	39
5.5.3.	Espectroscopía DLS (Dynamic Light Scattering).....	40
6.	CONCLUSIONES.....	45
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	46

## 1. RESUMEN

La elastina es una proteína fibrosa presente en la matriz extracelular de los vertebrados caracterizada por sus propiedades de elasticidad y resistencia a la fatiga. Por medio de ingeniería genética se han diseñado un polímero similar a la elastina (ELP) con múltiples funciones en el campo de la Biomedicina.

En este trabajo experimental se han bioproducido y purificado los polímeros tipo elastina (KI)<sub>2</sub> y (EI)<sub>2</sub>. Además, el polímero (EI)<sub>2</sub> se ha caracterizado físico-químicamente mediante técnicas como electroforesis en gel de poliacrilamida, cromatografía de exclusión por tamaños, espectrometría de masa MALDI-TOF, Espectroscopía de Resonancia magnética nuclear (RMN) y Espectroscopía DLS (Dynamic Light Scattering).

### ABSTRACT

Elastin is a fibrous protein present in the extracellular matrix of vertebrates characterized by its elasticity and fatigue resistance properties. By means of genetic engineering, an elastin-like polymer (ELP) with multiple functions in the field of biomedicine has been designed.

In this experimental work, elastin-like polymers (KI)<sub>2</sub> and (EI)<sub>2</sub> have been bioproduced and purified. In addition, the (EI)<sub>2</sub> polymer has been physico-chemically characterized by techniques such as polyacrylamide gel electrophoresis, size exclusion chromatography, MALDI-TOF mass spectrometry, Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) and Spectroscopy Dynamic Light Scattering (DLS).

## 2. INTRODUCCIÓN.

### 2.1. PROTEÍNAS

Las proteínas son un tipo de biomoléculas constituidas por monómeros, los aminoácidos, unidos por medio de un enlace peptídico<sup>1</sup>. Este enlace surge de la reacción de deshidratación entre un grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino del siguiente (Figura 1). Estos enlaces amida poseen características que lo aproximan más a un doble enlace debido a la estabilización del enlace C-N, lo que da lugar a la rotación del mismo.

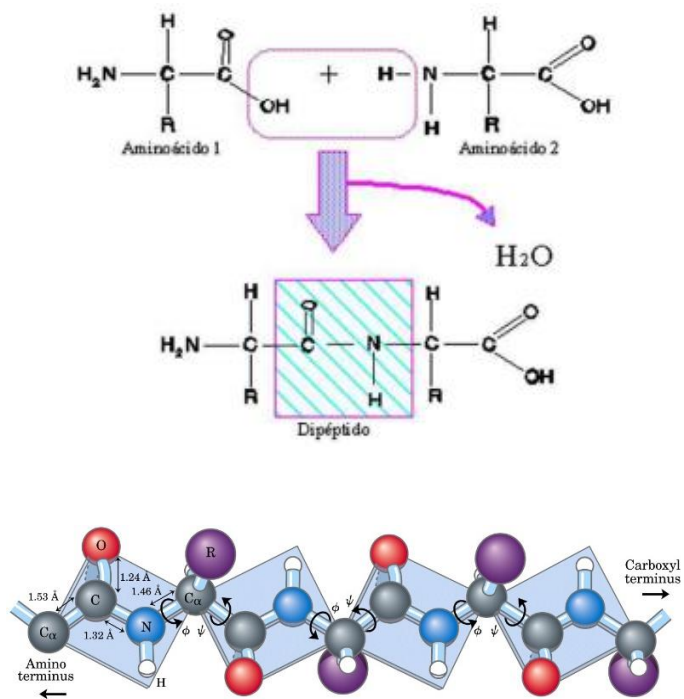


Figura 1: Reacción de formación de un enlace peptídico.<sup>1</sup>

Las proteínas presentan cuatro niveles de organización estructural en función de su complejidad (estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria).<sup>1, 2</sup>

Las proteínas se clasifican en dos grandes grupos: holoproteínas o proteínas simples (formadas únicamente por aminoácidos); y, heteroproteínas o proteínas conjugadas (formadas por una parte proteica y una no proteica, el grupo prostético).

En este trabajo se va a centrar en las proteínas simples o holoproteínas. Estas pueden ser globulares o fibrosas. Las proteínas globulares presentan una estructura terciaria plegada y compacta dando una forma más o menos esférica. Con esto, los presentes grupos hidrofílicos quedan hacia fuera de la estructura, haciendo que las proteínas de este tipo sean mayoritariamente solubles. Además, presentan múltiple función como enzimática, moléculas transportadoras, de defensas, receptores...

Por el contrario, las proteínas fibrosas presentan una estructura secundaria extendida y repetitiva de cadena larga; son menos solubles que las anteriores; y, presentan funciones bio-mecánicas, estructurales o de soporte y movimiento.<sup>3 y 4</sup>

### **2.1.1. Elastina**

La elastina es un tipo de proteína fibrosa que se encuentra en los tejidos de los vertebrados como componente de la matriz extracelular, debido a sus propiedades mecánicas (elasticidad, resistencia a la fatiga, durabilidad y capacidad de autoensamblaje).<sup>5</sup>

La estructura de la fibra de elastina se forma a partir del entrecruzamiento de entre las lisinas de su monómero precursor, la tropoelastina (compuesto por aproximadamente un 90% de aminoácidos hidrofóbicos)<sup>5 y 6</sup>. Contiene numerosos bloques repetidos entre los que destaca el  $(VPGVG)_n$ , que le dota de sus propiedades elásticas.

Una de las características más importantes de la elastina es la transición inversa con la temperatura. Esta propiedad se caracteriza por un cambio de conformación de la elastina a una determinada temperatura, denominada temperatura de transición. Debido a la gran cantidad de aminoácidos hidrofóbicos presentes en su estructura, por encima de la temperatura de transición, la elastina se compacta en una estructura esférica ordenada, siendo insoluble en medio acuoso; y, por debajo de la temperatura de transición, la elastina adopta una estructura extendida desordenada, siendo soluble en medio acuoso.<sup>7</sup>

### 2.1.2. Polímeros tipo elastina (ELP)

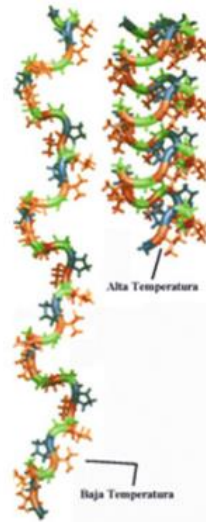
Los polímeros tipo elastina son un tipo de biomaterial artificial que consta de repeticiones cortas que se encuentran en la estructura de la elastina <sup>8</sup>, conservando sus propiedades mecánicas, su biocompatibilidad y autoensamblaje.<sup>9</sup>

Una de las características de estos polímeros es la biocompatibilidad en múltiples aplicaciones (en este caso, y de interés en el grupo de investigación, como vehículo de fármacos para el cáncer). Su estructura se basa en secuencias repetitivas tipo  $(VPGXG)_n$ , donde  $X$  (podría ser cualquier aminoácido, excepto la prolina) va a variar en función del polímero y modulará la temperatura de transición de los mismos.

Estos ELP se pueden diseñar genéticamente controlando su composición de aminoácidos y sus propiedades.<sup>9</sup>

Al igual que la elastina, los ELP también se caracterizan por su temperatura de transición, alcanzando un estado agregado a temperaturas por encima de su temperatura de transición, causa de una disminución de la entropía; y, una conformación extendida a temperaturas menores de su temperatura de transición, debido a un aumento en la entropía. Este hecho es destacable puesto que en la mayoría de las proteínas ocurre a la inversa.<sup>10</sup>





*Figura 2: Representación de las cadenas extendida desordenada y plegada ordenada de los polímeros tipo elastina.<sup>10</sup>*

## 2.2. POLÍMERO (KI)<sub>2</sub>

El polímero (K<sub>48</sub>I<sub>60</sub>)<sub>2</sub> o (KI)<sub>2</sub> se trata de un polímero sintético obtenido por el grupo de investigación, que consta de dos bloques: uno hidrofílico, bloque K cuya secuencia es (VPGKG)<sub>48</sub> según el código de la letra de los aminoácidos, con una temperatura de transición de 70 °C; y, otro hidrofóbico, bloque I= (VGIPG)<sub>60</sub>, con una temperatura de transición de 17°C<sup>11</sup>. La secuencia completa del polímero proteico (KI)<sub>2</sub> es MESLL[(VPGKG)<sub>48</sub>(VGIPG)<sub>60</sub>]<sub>2</sub>V cuyo peso molecular es de 93,726 kDa. La proporción de aminoácidos del (KI)<sub>2</sub> se representa en la tabla 1. Los aminoácidos característicos que van a dar la propiedades requeridas a este biopolímero son la lisina e isoleucina.

*Tabla 1: Proporción de aminoácidos del biopolímero (KI)<sub>2</sub>.*

Cantidad	%	AA
1	0,09	M
1	0,09	E
1	0,09	S
2	0,18	L
217	19,96	P
432	39,74	G
217	19,96	V
120	11,04	I
96	8,83	K
1087	100%	

La lisina coexiste en varias formas iónicas en función del entorno que posea y del pH. De acuerdo con la forma iónica presente la proteína va a solubilizar o precipitar, es decir, si el aminoácido se encuentra cargado, va a presentar más tendencia a formar puentes de hidrógeno con el agua, y por lo tanto, va a solubilizar (Figura 3) .

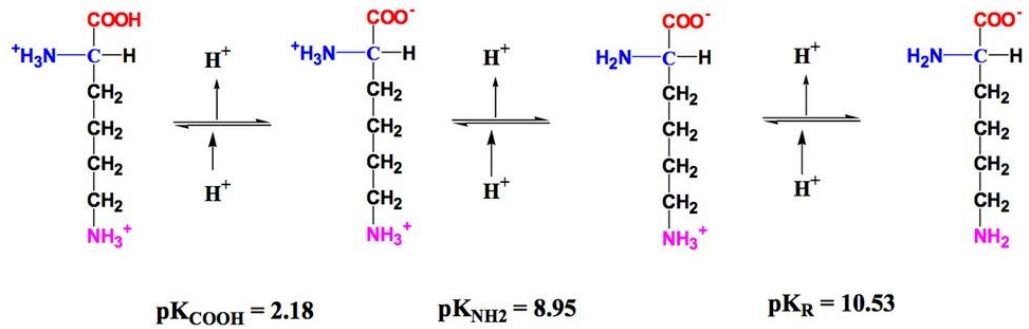


Figura 3: Formas iónicas de la lisina.

El copolímero (KI)<sub>2</sub> es un polímero catiónico altamente estable que interacciona adecuadamente con las mucinas de la superficie celular y el epitelio al estar estas cargadas negativamente.

### 2.3. POLÍMERO (EI)<sub>2</sub>

El polímero (E<sub>50</sub>I<sub>60</sub>)<sub>2</sub> o (EI)<sub>2</sub> se trata de un copolímero sintético en bloque obtenido por el grupo de investigación que consta de dos bloques: uno hidrofílico, bloque E=[(VPGVG)<sub>2</sub>(VPGEG)(VPGVG)<sub>2</sub>]<sub>10</sub>, con una temperatura de transición de aproximadamente de 70 °C; y, otro hidrofóbico, bloque I= (VGIPG)<sub>60</sub>, con una temperatura de transición de 15°C<sup>11</sup>. Por lo tanto, el autoensamblaje de los polímeros (EI)<sub>2</sub> en condiciones fisiológicas (37°C) se debe únicamente al bloque que contiene isoleucina, ya que el bloque que contiene ácido glutámico permanece soluble (figura 4). La secuencia completa del polímero proteico (EI)<sub>2</sub> es MESLL{[(VPGVG)<sub>2</sub>(VPGEG)(VPGVG)<sub>2</sub>]<sub>10</sub> (VGIPG)<sub>60</sub>}V cuyo peso molecular es de 93,176 kDa.

La proporción de aminoácidos del polímero se representa en la tabla 2. Los aminoácidos característicos que van a dar la propiedades a este biopolímero son el ácido glutámico e isoleucina.

Tabla 2: Proporción de aminoácidos del biopolímero (EI)<sub>2</sub>.

Cantidad	%	AA
1	0,09	M
21	1,9	E
1	0,09	S
2	0,18	L
221	19,96	P
301	27,19	V
440	39,75	G
120	10,84	I
1107	100	

El ácido glutámico existe en varias formas iónicas en función del pH que tenga. De acuerdo con la forma iónica presente la proteína va a experimentar un cambio en su solubilidad, es decir, al igual que en el caso de la lisina, si el aminoácido se encuentra cargado, va a tender a solubilizar todo el polímero.

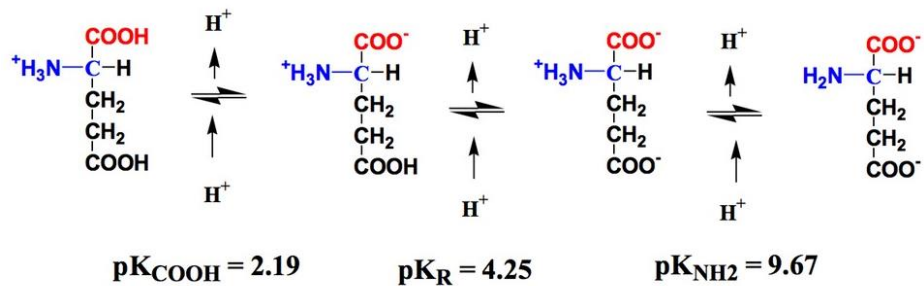


Figura 4: Formas iónicas del ácido glutámico.

A diferencia de (KI)<sub>2</sub>, (EI)<sub>2</sub> es un copolímero aniónico altamente estable pero que no interacciona con la superficie celular al ser esta negativa.

### 3. OBJETIVOS.

En este trabajo experimental plantea realizar la bioproducción de dos ELPs, (KI)<sub>2</sub> y (EI)<sub>2</sub> mediante su biosíntesis y su caracterización. Como se ha comentado en el apartado de Introducción, los polímeros tipo elastina tienen múltiples propiedades que les confieren diversas aplicaciones en el campo de la Biomedicina. Por lo tanto en este trabajo se ha pretendido efectuar la producción, purificación y caracterización de dos de estos biopolímeros.

Para llevar a cabo este trabajo, se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Producir a pequeña y media escala los recombinámeros propuestos, para posteriormente purificarlos mediante la segregación reversible dependiente de la temperatura, utilizando la propiedad de transición inversa con la temperatura de estos polímeros.
- Realizar una caracterización físico-química de ambos polímeros empleando diferentes técnicas: electroforesis en gel de poliacrilamida, cromatografía de exclusión por tamaños, espectrometría de masa MALDI-TOF, Espectroscopía de Resonancia magnética nuclear (RMN) y Espectroscopía DLS (Dynamic Light Scattering).

#### 4. MATERIALES Y MÉTODOS.

##### 4.1. MATERIALES.

###### 4.1.1. Reactivos químicos

- Auto Induc Medium (TB), Formedium.
- Tris Base, Formedium.
- EDTA, Formedium.
- SDS, Formedium.
- Cloruro sódico (NaCl), Formedium.
- Glycerol, Thermo Fisher.
- Cloruro de cobre (II), Acros.
- TEMED ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), Thermo Fisher.
- Ácido clorhídrico (HCl), Thermo Fisher.
- Isopropanol, Thermo Fisher.
- Hidróxido de sodio (NaOH).
- PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), Apollo Scientific.
- Butanol, Panreac.
- Etanol, Panreac.
- Glucosa, Merck.
- Acrilamida, VWR Life Science.
- LB Agar 2x, Formedium.
- Auto Induction Media (LB AIM), Formedium.
- LB Broth 2x, Formedium.
- Benzimidine hydrochloride hydrate 98%, Acros Organics.
- PBS PH 7.2 (10x), Gibco.
- Agua deuterada (D<sub>2</sub>O)
- Ampicilina 1000x, Formedium.
- PSA (persulfato de amonio), Thermo Fisher.

###### 4.1.2. Disoluciones tamponadas

- **Tampón de carga de electroforesis de proteínas:** Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2% (p/v), glicerol 10% (v/v), 2-ME 5% (v/v) y azul de bromofenol 0,025% (p/v)
- **Tampón fosfato salino PBS:** 4mM (fosfato de potasio monobásico 1,06 mM fosfato de potasio dibásico 2.97 mM) pH 7,4 NaCl 155 mM.
- **Tampón de sonicación:** Tris-base 20 mM, pH 8; 1mM EDTA.
- **Tampón de lavado:** NaCl 0,1M; Tris-base 10mM; pH 7,5.
- **Tampón acético/acetato** 0,1 M, pH 4.5.
- **Running buffer x5:** Tris base 0,124 M; Glicina 0,96 M; SDS 17mM pH 8,3.
- **SDS- PAGE:** Consta de un gel separador y un gel compactador cuya composición es:

	Resolving Gel	Stacking Gel
<b>Acrylamide</b>	10%	4%
<b>Tris 1,5M pH 8,8</b>	0,376M	-
<b>Tri 0,5M pH 6,8</b>	-	0,125M
<b>MQ</b>	3,63 mL	1,585 mL
<b>SDS 10%</b>	0,10%	0,08%
<b>Persulfato 10%</b>	1,30%	0,08%
<b>TEMED</b>	3,75 $\mu$ L	2,35 $\mu$ L

#### 4.1.3. Ceba bacteriana

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

#### 4.1.4. Medios de cultivo y suplementos

- **LB-agar:** Se prepara en una disolución de 25 g/L del medio LB y 15 g/L de bacto-agar; pH 7,0. Es el medio gelatinoso o utilizado para el recubrimiento de las placas de cultivo bacteriano. El medio atemperado (50-60 C $^\circ$ ) se vierte en las placas de cultivo bacteriano Petri (unos 30 mL), y solidificará al enfriarse permitiendo su posterior uso para la siembra de cultivos bacterianos y aislamiento de clones
- **TB (Terrific Broth) (Formedium™):** Su composición es de 20 g/L de bacto-triptona, 24 g/L de extracto de levadura, 4 mL/L de glicerol, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,017 M y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,072 M; pH 7,0. Es el medio líquido utilizado para aumentar la biomasa, es decir, para la expresión de polímeros recombinantes tipo elastina.
- **Ampicilina de sodio:** se prepara una solución 1000 veces más concentrada 100 mg/mL respecto a la concentración de trabajo de 0,026 M.
- **Glucosa:** se usó una solución 20 veces más concentrada con una molaridad de 1,1 M.

## **4.2. MÉTODOS.**

### **4.2.1. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida**

La electroforesis se basa en un método de separación y caracterización de diferentes moléculas por aplicación de un campo eléctrico.

En este trabajo se ha utilizado la electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS), es decir SDS-PAGE, para la separación de proteínas en función de su densidad de carga (relación carga / masa). Para ello el gel se prepara siguiendo básicamente el protocolo para sistemas discontinuos, descrito por Laemmli. El SDS desnatura por completo las proteínas y rompe las interacciones no covalentes que determinan la estructura terciaria y cuaternaria; y además va a proporcionar una carga negativa por cada dos residuos de aminoácidos, induciendo un movimiento simultáneo de las proteínas por la presencia del campo eléctrico aplicado. Así, las proteínas se van a separar únicamente en función de su peso molecular.

Asimismo, el gel consta de dos partes: un gel separador, que separa las proteínas en función de su masa molecular; y un gel concentrador (en la parte superior del gel) en menor proporción, que alinea las proteínas en una fina banda que entra al mismo tiempo y velocidad en el gel separador. El gel separador se prepara en una concentración de acrilamida 10% (w/v) debido al peso molecular de ambos polímeros

Una vez preparado el gel, se preparan las muestras a analizar, incubándolas durante 5 minutos a 100 °C en tampón de carga de electroforesis en condiciones reductoras. Este tampón se encarga de eliminar las conformaciones de las proteínas; permitir el seguimiento del frente de la electroforesis conteniendo un trazante, el azul de bromofenol; y además contiene detergente SDS, proporcionando carga negativa a las proteínas y dirigiendo su movimiento hacia el polo opuesto por la corriente eléctrica aplicada.

Preparadas las muestras, se aplican 5 µL en los pocillos del gel, y se emplea un aparato "MiniVE vertical electrophoresis system" de Hoefer para la electroforesis con una intensidad de corriente de 25 mA durante unos 90 minutos a temperatura ambiente. Además de las muestras a ensayar, se aplican una mezcla comercial de marcadores de masa molecular conocida, con la finalidad de comparar el peso molecular de las proteínas.



Finalizada la electroforesis, se tiñe el gel con una disolución de cloruro de cobre 0,3 M durante 6 minutos en un agitador basculante (Galileo) a temperatura ambiente, y, posteriormente se lava con agua destilada. Las bandas se observan empleando el programa *Gel Doc™ Imager*, en el que se usa un transiluminador de luz blanca.

Además se ha probado la tinción de BlueSafe GelCode™, para los geles de (KI)<sub>2</sub>, con la finalidad de obtener un mayor contraste y mejor visualización de las bandas. (Figura 5)

Para ello se lava el gel en agua ultrapura durante dos minutos y se tiñe durante 40 minutos en agitación constante, al igual que la tinción con cloruro de cobre. Finalmente se destiñe en agua ultrapura durante una hora y se analiza con el programa *Gel Doc™ Imager*.

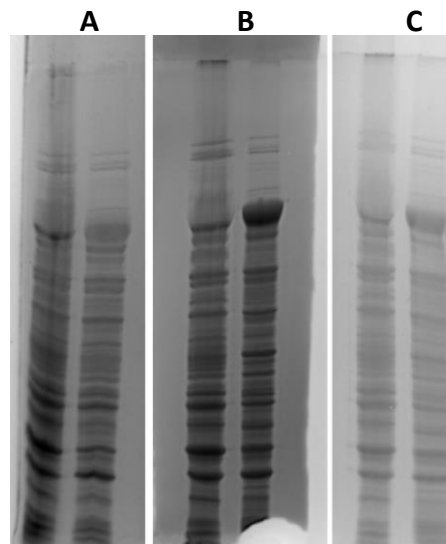


Figura 5: Comparación de diferentes tinciones utilizadas para distinguir el biopolímeros respecto a las proteínas bacterianas. En la imagen A muestra de (EI)<sub>2</sub> y (KI)<sub>2</sub> respectivamente, con tinción Biotium One-Step Blue Protein Gel Stain. En la imagen B, muestra de (EI)<sub>2</sub> y (KI)<sub>2</sub> con tinción BlueSafe GelCode™ Fisher. En la última imagen, C, muestra de (EI)<sub>2</sub> y (KI)<sub>2</sub> con tinción BlueSafe NZYtech

#### 4.2.2. Selección de la colonia más productora (Screening)

Se ha proporcionado, por el grupo de investigación, los clones de las bacterias productoras *E.coli* BLR (DE3) que contienen en su interior el plásmido que produce la proteína de interés, en este caso, (KI)<sub>2</sub> o (EI)<sub>2</sub>.

Se siembra en un placa Petri LB-Agar (con glucosa y el antibiótico correspondiente, en este caso ampicilina para ambos polímeros) el clon de la bacteria con un sutil rayado de la placa, y, se almacena en la incubadora estática a 37°C durante aproximadamente 16 horas. La placa

tiene que disponerse boca abajo, para que la condensación que se pueda producir no interfiera en el crecimiento de las colonias, y, además, se debe tapar con papel aluminio debido a que el mismo resiste cambios de temperatura y humedad, y, lo más importante, permite el paso de oxígeno para el crecimiento de bacterias.

Una vez se observe el crecimiento de las colonias, se seleccionan 8 colonias bien aisladas y se analiza la calidad de la expresión del polímero recombinante en la fracción proteica total. Para eso tras la producción en medio líquido de inducción TB complementado con ampicilina a 37°C con agitación orbital de 250 rpm, durante aproximadamente 16 horas, se toma una muestra de 1mL. Las bacterias se por centrifugación a 12000xg durante 1 minuto, el sedimento se resuspende en 1mL de agua ultrapura y se repite la centrifugación suspendiendo el precipitado en tampón de carga de electroforesis. Finalmente, las muestras se hierven 2 minutos, y se realiza una electroforesis de las proteínas totales expresadas por cada colonia en gel de poliacrilamida

A partir de la selección de la colonia más productora, da comienzo el proceso de bioproducción.

#### **4.2.3. Producción de biopolímeros recombinantes.<sup>11</sup>**

La biosíntesis de los biopolímeros recombinantes (KI)<sub>2</sub> y (EI)<sub>2</sub> proceden de la misma manera detallado a continuación.

Comienza con la preparación del preinóculo, que consiste en el cultivo de la colonia más productora, seleccionada en el proceso 4.2.2, en 5 mL de LB complementado con ampicilina y glucosa. Una vez cultivado, se incuba a 37 °C y con agitación orbital de 250 rpm durante toda la noche (18 horas, durante ese tiempo se alcanza una masa suficiente de células bacterianas).

El día siguiente se prepara el inóculo transfiriendo 100 µL del preinóculo a 30 mL de LB suplementados con ampicilina y glucosa en dos matraces Erlenmeyer estériles que se incuban durante aproximadamente 5 horas a 37 °C y en agitación de 250 rpm. De esta forma se asegura que el inóculo este en una fase de crecimiento exponencial, condición necesaria

para la bioproducción del polímero recombinante a mayor escala. Para ello, se toman Flask estériles de dos litros necesarios para producir 6 litros (en total 15 Flask). El volumen de medio en los Erlenmeyers no debe superar el 20-25% de su capacidad para favorecer una buena oxigenación del cultivo mediante la agitación.

Se le añaden a cada uno de ellos 400 mL de medio de cultivo TB/LB suplementado con ampicilina, en proporción 2/3 TB y 1/3 LB para un balance de expresión génica adecuado y, 4 mL de inóculo. Se cultivan los matraces a 37 °C y 250 rpm durante al menos 16 horas.

Transcurrido este tiempo, se toman muestras en períodos de 30 minutos para realizar un seguimiento del crecimiento bacteriano por turbidimetría. Se analiza su absorbancia a 600 nm, con dilución 1:10 de agua ultrapura, utilizando el medio de cultivo como blanco de la medida. Si se observa que la absorbancia no varía, el crecimiento celular se encontrará en etapa estacionaria, o disminuye (decrecimiento celular) se detiene la producción incubándola en hielo.

La composición de la fracción proteica total de las muestras tomadas durante la producción se analiza por electroforesis para asegurar el rendimiento de la producción.

Una vez terminada la producción, se procede al lavado de células para que el medio de cultivo no contamine el polímero final. Para ello se transfiere el contenido de los flask en botes de centrifuga de 1 L, y se sedimentan las células centrifugando durante 15 minutos a 1700 xg a 4 °C. Posteriormente se decanta el sobrenadante y se añade tampón de lavado (aproximadamente 100 mL/L de cultivo). Se resuspende el cultivo sedimentado y se pasan a botes de centrifuga de 250 mL. Acto seguido se somete a una centrifugación durante 15 minutos a 1700 xg y 4°C. Se repite el proceso hasta que en el sobrenadante no queden trazas del medio de cultivo (observación de sobrenadante prácticamente incoloro).

Para finalizar el proceso de producción, se procede a la ruptura celular. Las bacterias se lisan mediante sonicación, el cultivo sedimentado tras su resuspensión en Buffer de sonicación junto con PMSF (un inhibidor de proteasas), y, clorhidrato de benzamidina hidratado. Se realiza un proceso de sonicación durante 15 minutos para favorecer la ruptura de las membranas de las células, y así, liberar el polímero de interés. Se utiliza el equipo, aportado por el grupo Procereal, Hielscher UP400St, en condiciones de amplitud máxima del 100% y

ciclos con pulsos de 10 segundos cada 10 segundos, durante los 15 minutos, a una temperatura de aproximadamente 4°C y con agitación constante.

Se realiza una centrifugación a 1600 xg durante 15 minutos a 4°C con la finalidad de recuperar (debido a su mayor peso) en el sedimento las bacterias que no hayan lisado. Esta fracción se vuelve a sonicar para conseguir maximizar la lisis de células.

Posteriormente se centrifuga el lisado bacteriano durante 45 minutos a 16000 xg a 4°C, para separar el sobrenadante que constituye la fracción soluble total, desde el sedimento, la fracción insoluble total. Se analizan ambos por electroforesis para individuar donde se encuentra mayoritariamente el polímero de interés.

#### **4.2.4. Purificación de biopolímeros recombinantes.**

##### *4.2.4.1. Purificación del biopolímero recombinante (KI)<sub>2</sub>*

Finalizado el proceso de producción, se procede a la purificación del mismo. Debido a las dificultades encontradas en el proceso de purificación del biopolímero (KI)<sub>2</sub> se han realizado varios experimentos que se detallarán en el apartado de “Resultados y discusión”.

##### *4.2.4.2. Purificación del biopolímero recombinante (EI)<sub>2</sub>*

Tras la sonicación, da comienzo la purificación de la proteína con una serie etapas sucesivas de calentamiento-precipitación y enfriamiento-resuspensión.

El sobrenadante de la centrifugación se acidifica hasta un pH 4 manteniendo la muestra en hielo y en agitación para que precipiten proteínas bacterianas ácidas y DNA mientras que la proteína de interés se mantiene soluble. Se retira por centrifugación a 16000 xg, 45 min a 4°C. Se analiza el sobrenadante y el pellet obtenido por electroforesis en gel de poliacrilamida, para corroborar que la proteína de interés se encuentra en el sobrenadante.

El sobrenadante se incuba a 42°C durante dos horas con el fin de que el polímero precipite. Se separa el precipitado centrifugando a 25°C, 10000g durante 15 minutos. Se comprueba

la presencia del biopolímero (EI)<sub>2</sub> en el sobrenadante y en el precipitado obtenidos por electroforesis en gel de poliacrilamida para constatar que la proteína (EI)<sub>2</sub> está en el pellet.

Se resuspende el precipitado en tampón Tris a pH 8,8, 20mM, en agitación a 4°C durante 16 horas, para disolver la proteína, gracias a la propiedad de transición inversa con la temperatura.

Se centrifuga la disolución a 4°C, 18000 xg durante 15 minutos para clarificar la muestra.

Al sobrenadante obtenido, se le añade NaCl 1M con la finalidad de que el polímero precipite (debido a la mayor afinidad de la sal por el agua, esta va a interaccionar con la sal dejando libre al polímero y disminuyendo su temperatura de transición). Se calienta durante dos horas a baño maría a 42°C. La resuspensión obtenida se centrifuga a 25°C y 10000 xg, durante 15 minutos.

El precipitado obtenido se resuspende en 25 mL de agua ultrapura, y se agita a 4°C durante 16 horas. Con esto se consigue que la proteína se rehidrate y pase al sobrenadante.

Posteriormente se centrifuga de nuevo a 18000 xg, 4°C durante 15 minutos.

Se vuelve a repetir la etapa de purificación por precipitación con sal y su posterior disolución en agua ultrapura, mencionada anteriormente.

Si el polímero ya estuviese lo suficientemente puro (analizado por electroforesis en gel de poliacrilamida) se realiza una diálisis, y finalmente, se liofiliza para obtener la proteína de interés pura.

Se recolectaron muestras de todas las etapas realizadas que fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida.

#### **4.2.5. Cromatografía de exclusión por tamaños**

La cromatografía de exclusión por tamaños es una técnica analítica basada en la separación de componentes en función de su tamaño molecular. Se basa en la separación de los componentes en dos fases: una fase estacionaria (columna) y una fase móvil líquida.<sup>12</sup>

En la columna se utiliza una matriz porosa que retiene las moléculas más pequeñas, eluyendo primero las moléculas de mayor tamaño molecular al no retenerse en dicha matriz. La elución de dichas moléculas se detecta mediante un detector de absorbancia UV a 210nm.

Se ha utilizado una columna preparativa “Superdex 75” de 75 cm de altura y 26 mm de diámetro encamisada.

#### **4.2.6. Caracterización biopolímeros recombinantes.**

Se han previsto utilizar diferentes técnicas (que se detallarán a continuación) para la caracterización físico-química de los biopolímeros recombinantes.

##### *4.2.6.1. Espectrometría de masas (MALDI-TOF)*

La espectrometría de masas es una técnica de análisis cualitativo y destructivo para la determinación de átomos e incluso moléculas de mayor tamaño. Se fundamenta en la obtención de iones gaseosos que posteriormente se van a separar en función de su relación masa/carga.<sup>13</sup>

En este trabajo se va a utilizar la espectroscopía de desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI) combinada con un analizador por tiempo de vuelo (TOF)

El análisis de la muestra se realiza en el Laboratorio de Técnicas instrumentales (LTI) de la Universidad de Valladolid, por técnicos de dicho laboratorio.

#### 4.2.6.2. *Espectroscopía de Resonancia magnética nuclear (RMN)*

La resonancia magnética nuclear es una técnica analítica basada en las propiedades magnéticas de los núcleos atómicos y se utiliza para determinar la composición y la estructura de las moléculas. En la espectroscopia de RMN, se somete una muestra a un campo magnético y se aplica una secuencia de pulsos de radiofrecuencia. Los núcleos atómicos en la muestra absorben energía y generan señales de sonido magnético. Estas señales se registran y se utilizan para construir un espectro de RMN, que muestra las frecuencias de sonido y las intensidades relativas de los núcleos presentes en la muestra.<sup>14</sup>

El análisis de la muestra se realiza en el Laboratorio de Técnicas instrumentales (LTI) de la Universidad de Valladolid, por técnicos de dicho laboratorio. El laboratorio presenta dos equipos de resonancia de 400 o 500 Hz. En este caso se ha realizado el espectro con el equipo de 500 Hz.

Se le aporta una muestra disuelta en agua deuterada, con una concentración final del 10mg/mL., en un tubo de RMN.

#### 4.2.6.3. *Espectroscopía DLS (Dynamic Light Scattering)*

La espectroscopía DLS (Dynamic Light Scattering) es una técnica utilizada para medir el tamaño de partículas en el rango nanométrico. En la espectroscopía DLS, se envía un haz de luz a una muestra líquida y se mide la intensidad de la luz dispersada a diferentes ángulos. A medida que las partículas se mueven en la solución, se producen fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada, lo que permite calcular el tamaño de las partículas. Además, también permite calcular el potencial zeta para detectar la carga superficial que rodea a la partícula.

El análisis de la muestra se realiza en el Laboratorio de Técnicas instrumentales (LTI) de la Universidad de Valladolid. Para ello, se disuelve la muestra en agua ultrapura en concentración 1 mg/mL, y se mide en una cubeta micro ZEN0040 el tamaño de partícula

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

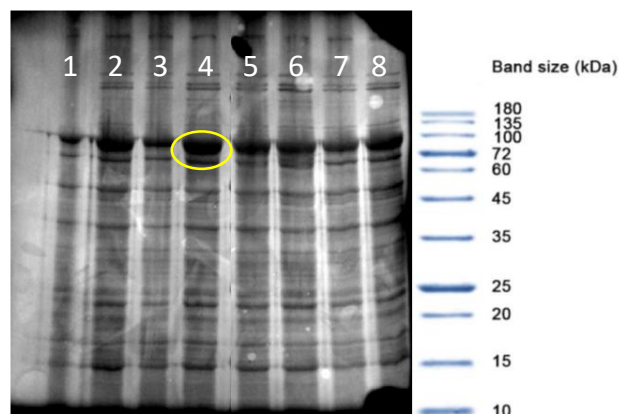
En este trabajo se ha llevado a cabo la bioproducción de dos polímeros proteicos recombinantes:  $(KI)_2$  y  $(EI)_2$ . Así, en este apartado se presentarán e ilustrarán los resultados obtenidos.

Se ha partido de las bacterias de expresión que contenían los correspondientes plásmidos codificantes generados anteriormente en el grupo de investigación para producir los diferentes polímeros llevados a cabo en este trabajo.

### 5.1. Producción del biopolímero recombinante $(KI)_2$

Se han llevado a cabo 3 bioproducciones del biopolímero recombinante  $(KI)_2$  cuyo peso molecular teórico es 93,726 kDa.

Partiendo del clon de la bacteria proporcionada, se realiza el screening de expresión (apartado 4.2.2.) donde se analizan y comparan los extractos de las proteínas totales del caldo de cultivo de varias colonias para elegir la más productora, es decir, la que en proporción más polímero genera en un determinado tiempo y la que se va a utilizar para la producción del mismo, es la colonia 4. (Figura 6)



*Figura 6:* Screening de producción de las colonias analizado en gel de poliacrilamida. A la derecha se observa el marcador Unstained Protein Molecular Weight Marker, y a la izquierda 8 colonias seleccionadas en orden creciente (1-8). En amarillo se marca la colonia más productora, cuya banda correspondiente al biopolímero es proporcionalmente mayor.

Para realizar el escalado de la producción (4.2.3) se procede a la producción del preinóculo (a partir de la colonia 4) en medio LB con ampicilina como antibiótico y glucosa 1%. Se utiliza



ampicilina por que el plásmido de expresión confiere resistencia al antibiótico únicamente a las bacterias que lo contienen; es decir determina una ventaja selectiva a las bacterias productoras. La glucosa favorece el crecimiento de la biomasa (número de las bacterias) hasta su agotamiento en el medio inhibiendo la producción del polímero. Es importante para poder obtener un número elevado de bacterias en el cultivo. Tras haber acabado las fuentes de carbono preferenciales para su metabolismo (glucosa y glicerol), utilizarán la lactosa que determinará el inicio de la producción del biopolímero, y simultáneamente el arresto del crecimiento del cultivo.

Se deja incubando durante toda la noche en agitación a 250 rpm y 37°C. Se prepara del inóculo partiendo del preinóculo incubándolo durante 5/6 horas a 37°C en medio con las mismas características.

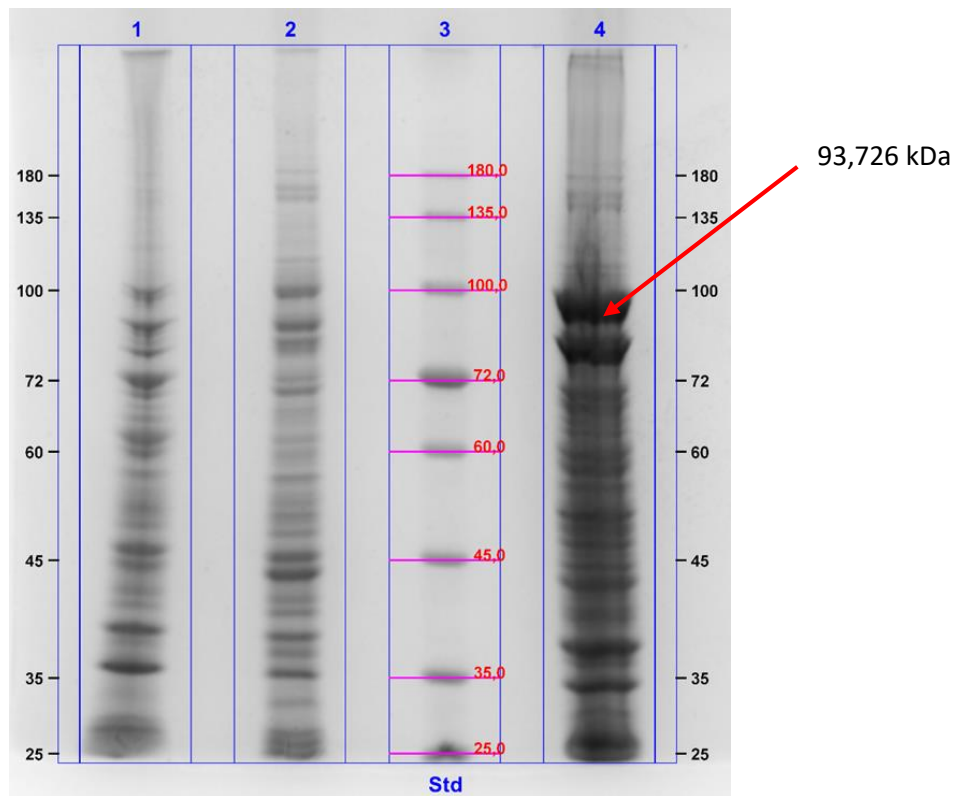
Se escala la producción inoculando 5 L del medio TB/LB y se incuba durante toda la noche (en las mismas condiciones mencionadas anteriormente de temperatura y agitación). La etapa de expresión se finaliza, tras medir las absorbancias cada media hora para realizar un seguimiento de la producción (Tabla 3).

Tabla 3: Seguimiento del crecimiento bacteriano de las dos producciones del polímero (KI)<sub>2</sub>

Producción 1			Producción 2			Producción 3		
Tiempo de expresión (h)	Dilución	Absorbancia 600 nm	Tiempo de expresión (h)	Dilución	Absorbancia 600nm	Tiempo de expresión (h)	Dilución	Absorbancia 600nm
21	1:10	6,32	21	1:10	2,79	21	1:10	7,16
21.3	1:10	5,61	21,30	1:10	3,98	21.3	1:10	7,88
			22	1:10	3,84			

Se puede observar en la producción 1, una disminución de la absorbancia entre las 21 h y las 21.3 h de expresión. Esto quiere decir que las bacterias están en la fase de muerte celular y, por lo tanto, se detiene la producción. En la segunda y tercera producción, al no variar en gran medida la absorbancias entre horas, se para la detección puesto que el crecimiento bacteriano se encuentra en su fase estacionaria cuando la producción de los polímeros recombinantes es máxima. En la segunda producción, se ha observado un menor crecimiento bacteriano, debido a su menor absorbancia (en comparación con la primera y tercera producción) siendo la absorbancia linealmente proporcional a la concentración en medidas cuyo valor sea inferior a 1. Se ha pensado, que esto es debido al menor tiempo de incubación del inóculo.

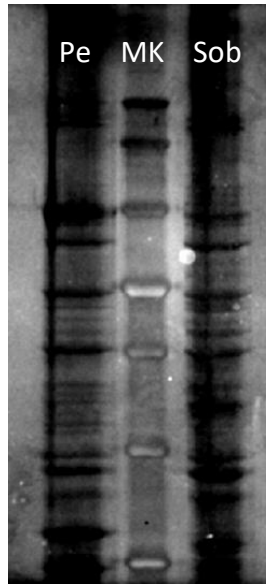
Además se ha realizado un seguimiento por electroforesis en gel de poliacrilamida (según lo indicado en el apartado 4.2.1), de cada producción, para verificar el crecimiento bacteriano. (Figura 7)



*Figura 7: Electroforesis en gel de poliacrilamida del seguimiento del crecimiento bacteriano de las diferentes etapas de la tercera producción. En la primera calle se encuentra el preinóculo, seguida del inóculo. En la tercera calle se encuentra el marcador de peso molecular (Marker), y por último, la producción.*

Se observa en la imagen anterior, que los inóculos presentan menor producción, así como, menor intensidad de bandas debido al uso de diferentes medio y el uso de glucosa como represor.

Según lo explicado en el apartado 4.2.3, se para la producción enfriando con hielo y se recogen las bacterias por centrifugación. Se procede al lavado de células con buffer de lavado y su posterior lisis mediante el proceso de sonicación. Se ha realizado una nueva electroforesis posterior a la centrifugación tras la sonicación de las bacterias para visualizar en que fracción se encuentra el polímero de interés. (Figura 8)



*Figura 8: Electroforesis en gel de poliacrilamida tras la sonicación. A la derecha se representa el pellet en el cual se visualiza la fracción de las proteínas insolubles totales, seguido del Marker y el sobrenadante en último lugar donde se visualiza la fracción de las proteínas solubles bacterianas.*

Se ha observado en las producciones realizadas que se tiene mayor cantidad de polímero en el pellet, debido a que la producción se realiza a pH neutro y a temperatura fisiológica, por lo que las lisinas del polímero probablemente se encuentran sin carga y por tanto tiende a precipitar.

## **5.2. Purificación del biopolímero recombinante (KI)<sub>2</sub>.**

Atendiendo a lo comentado en el apartado 4.2.4.1. y debido a la mala purificación del presente biopolímero, se han realizado diversos experimentos para intentar purificar el mismo.

En primer lugar se ha procedido con las purificaciones puestas a punto por estos tipos de polímeros, es decir se realizan ciclos de precipitaciones calientes y frías (Hot Spin-Cold Spin) para eliminar los residuos que pudieran quedar.

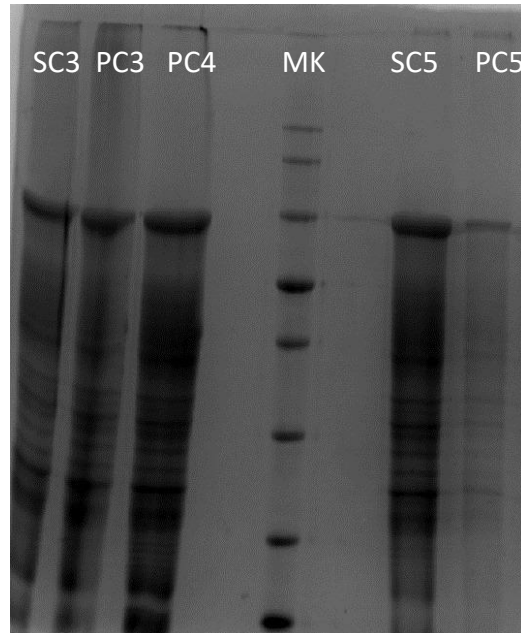
Se añade NaCl hasta una concentración final de 5 M y se lleva a baño María durante 45 minutos a 25°C. Con esto se consigue que el polímero quede en suspensión debido a la mayor afinidad de NaCl por el agua.

Se centrifuga la suspensión a 9500 xg durante 15 minutos a 25°C. De esta manera se recupera el producto proteico en el pellet. Por lo tanto se descarta el sobrenadante.

Se resuspende el sedimento (donde se encuentra la proteína) en PBS frío y estéril, y dejarlo reposar en hielo durante 20 minutos para solubilizar la proteína y evitar la solubilización de otros contaminantes no deseados.

Se somete la disolución de la proteína a un centrifugado en frío a 20000 xg durante 40 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se transfiere a nuevos tubos estériles de 50 mL y se repiten los ciclos hasta que no se observen contaminantes después del centrifugado en frío.

Se han realizado un total de 8 ciclos de purificación, sin observación de purificación alguna, debido a la apreciación de otras bandas proteicas debajo de la banda del polímero de interés. (Figura 9)



*Figura 9: Electroforesis en gel de poliacrilamida de los ciclos de purificación del cultivo tras la sonicación. En la calle 1 y 2 se observan el sobrenadante y el pellet del ciclo 3 respectivamente; en la calle 3 el pellet del ciclo 4; en la calle 4 el Marker; en la calle 5, el sobrenadante del ciclo 5; y, en la calle 6 el pellet del ciclo 5.*

En segundo lugar, en una segunda producción se ha decidido disminuir el pH a 3,1 después de la sonicación, con la finalidad de que el grupo amino terminal de la lisina del polímero esté protonada, y se disuelva casi en su totalidad. Se deja en agitación durante toda la noche en frío. Se centrifuga en frío durante 45 minutos, a 18000g. Se añade NaCl hasta alcanzar una concentración 5M, se disuelve y se calienta a baño maría durante dos horas a 42°C; con esto se consigue la precipitación de la proteína debido a la mayor afinidad de la sal por el agua. La disolución caliente se centrifuga durante 15 minutos, 6500 xg a 25°C. El precipitado obtenido se le baja el pH a 3,5 y se deja en agitación en frío durante toda la noche para resuspender el polímero. Se centrifuga la disolución 25 minutos a 4°C y 16000 xg. Al sobrenadante obtenido se le realiza una cromatografía de exclusión por tamaños con la finalidad de aislar la fracción de polímero de interés. Para ello se ha resuspendido en tampón acético-acetato pH 4 - 138mM NaCl, y se pasa por la columna cromatográfica de exclusión molecular con un flujo de 6mL/min recogiéndose un total de 50 fracciones. Se midieron las absorbancias de todas las fracciones, escogiéndose aquellas de mayor absorbancia y se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida. (Figura 10)

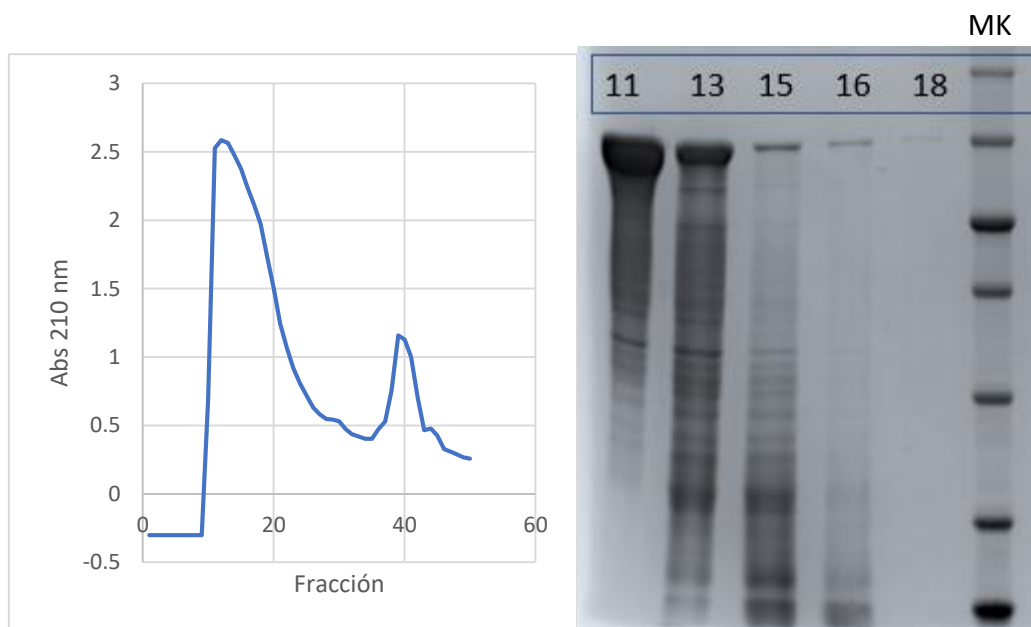
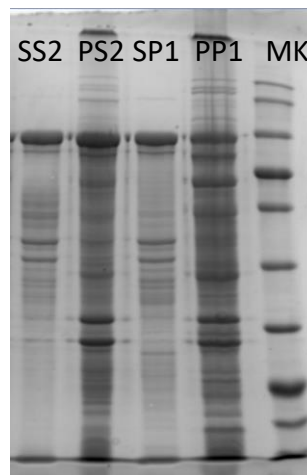


Figura 10: Electroforesis en gel de poliacrilamida y cromatograma de las fracciones seleccionadas tras la cromatografía de exclusión por tamaños.

Se puede observar en la imagen anterior como no se ha conseguido separar en gran medida el polímero de interés del resto de impurezas. Por ello, se ha decidido recurrir a otro procedimiento para purificar el biopolímero (KI)<sub>2</sub>.

En último lugar, se realizó una producción atendiendo a lo explicado en el apartado 4.2.3. Al sobrenadante (Sob1) y precipitado (Pe2) (resuspendido en agua) obtenidos tras el lisado de células, se baja ambos el pH a 3 para tener el grupo amino de la lisina cargado y se deja en agitación a 4°C durante toda la noche para disolverlo en su totalidad. Posteriormente se centrifugan las correspondientes disoluciones durante 45 minutos a 16000 xg y 4°C. Se analiza el sobrenadante y el precipitado, de sus respectivas disoluciones por electroforesis (Figura 11)



*Figura 11: Sobrenadante y pellet del proceso de purificación del biopolímero (KI)<sub>2</sub>. En las dos primeras calles se representa el sobrenadante y el pellet correspondientes al sobrenadante tras el sonicado. En la tercera y cuarta calle se representa el sobrenadante y el pellet correspondientes al pellet tras el sonicado.*

Se observa que hay mayor proporción y “más puro” del biopolímero en el sobrenadante por lo que se realizaron una serie de experimentos para conseguir la precipitación del polímero (Tabla 4). Se tomaron 5 muestras del sobrenadante, se añadió NaCl 1 M a todas ellas y se midió como variaba la absorbancia respecto al blanco (sin sal), observándose un pequeño aumento de la misma debido a la mayor solubilidad de la sal por el agua haciendo que el polímero comience a precipitar y haciendo que la temperatura de transición del polímero disminuya.

A estas muestras se le subió el pH de 7 a 11 para alcanzar el punto isoeléctrico del polímero, que según el programa protpi.ch<sup>15</sup> es de 11,9. Con esto se quiere conseguir la precipitación del polímero. Se midió las absorbancias sin observación de cambio alguno, excepto a pH 11 lo que corrobora que se ha alcanzado el punto isoeléctrico y el polímero se encuentra soluble.

Finalmente, se calentaron las 5 muestras a 42°C durante 5 minutos, con la finalidad de superar la temperatura de transición del polímero y que ayude a precipitar. Visualmente se observó cierta turbidez en la muestra a pH 11 (señal de precipitación) lo que se corroboró con una disminución en la absorbancia del mismo.

*Tabla 4: Experimentos para conseguir la precipitación del polímero.*

	ABSORBANCIA a 600 nm				
Muestra 1 (NaCl 1M) 4°C	0,034	pH 7 (4°C)	0,001	pH 7 (42°C)	0,004
Muestra 2 (NaCl 1M) 4°C	0,020	pH 8 (4°C)	0,011	pH 8 (42°C)	0,005
Muestra 3 (NaCl 1M) 4°C	0,013	pH 9 (4°C)	0,022	pH 9 (42°C)	0,004
Muestra 4 (NaCl 1M) 4°C	0,026	pH 10 (4°C)	0,010	pH 10 (42°C)	0,022
Muestra 5 (NaCl 1M) 4°C	0,039	pH 11 (4°C)	0,097	pH 11 (42°C)	0,042

Se centrifugan las 5 muestras 12000 xg durante 5 minutos a temperatura ambiente y se analizan sobrenadante y pellet de cada una por electroforesis en gel de poliacrilamida. (Figura 12)



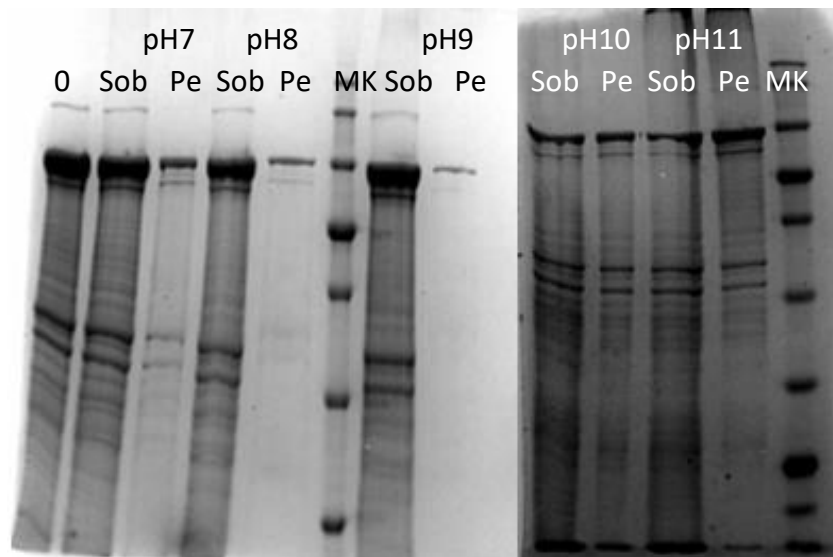


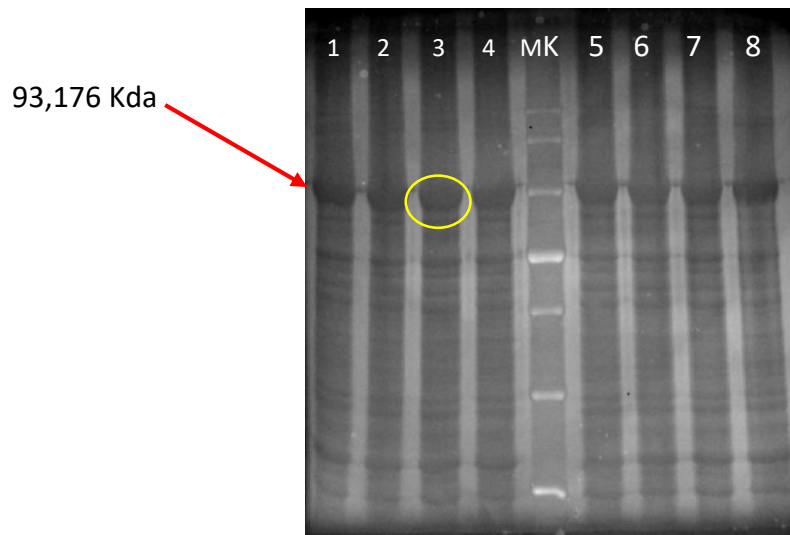
Figura 12: Electroforesis en gel de poliacrilamida. En la primera calle se representa la muestra sin tratar. En la segunda y tercera calle el sobrenadante y pellet a pH 7. En la cuarta y quinta calle, sobrenadante y pellet pH 8. En la sexta calle el Marker; y en la dos última calles de la imagen de la izquierda, sobrenadante y pellet a pH 9. En la imagen de la derecha se representa sobrenadante y pellet a pH 10 y sobrenadante y pellet a pH 11 respectivamente, finalizando con el Marker.

Observando la imagen se puede comprobar que no es hasta pH 10 que empieza a precipitar el polímero, consiguiendo una pequeña pero no suficiente, purificación del biopolímero recombinante (KI)<sub>2</sub>

### 5.3. Producción del biopolímero recombinante (EI)<sub>2</sub>

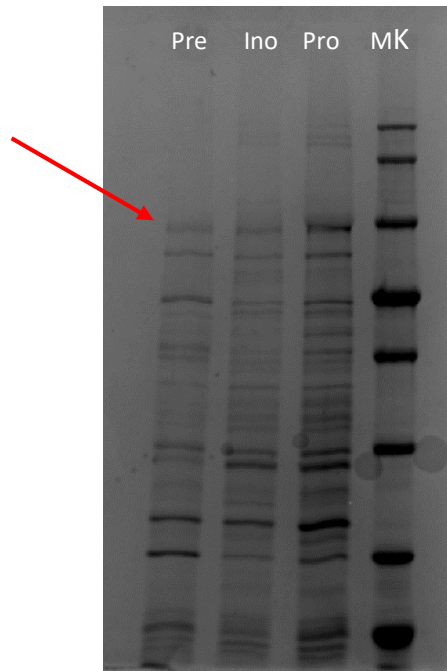
Se ha llevado a cabo una producción del biopolímero recombinante (EI)<sub>2</sub> cuyo peso molecular teórico es 93,176 Kda.

Partiendo del clon de la bacteria proporcionada, se realiza el screening de expresión (apartado 4.2.2.) al igual que en el polímero (KI)<sub>2</sub>, donde se observa que la colonia más productora es la colonia 3 aunque todas las colonias mostraron una abundante producción. (Figura 13)



*Figura 13:* Screening del clon del plásmido en gel de poliacrilamida. En la quinta columna se observa el marcador Unstained Protein Molecular Weight Marker, a su izquierda las 4 primeras colonias y a la derecha las 4 últimas. En amarillo se marca la colonia más productora (colonia 3).

Se ha llevado a cabo la producción del polímero, mediante el uso de un preinóculo y un inóculo, de manera análoga a la producción anterior, y se ha realizado un seguimiento de la producción del mismo por electroforesis en gel de poliacrilamida. (Figura 14)



*Figura 14: Electroforesis en gel de poliacrilamida para el seguimiento de la producción del polímero (EI)<sub>2</sub>. En la primera calle se observa el preinóculo, seguida del inóculo y la producción. Por último el Marker.*

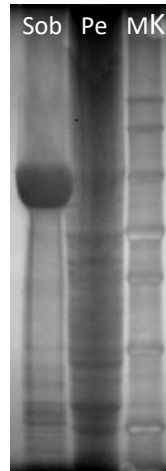
Se realiza el lavado de células y la ruptura de las mismas por sonicación, seguido de la purificación de la misma.

#### **5.4. Purificación de biopolímero recombinante (EI)<sub>2</sub>**

A diferencia de la purificación de (KI)<sub>2</sub>, en la purificación que se comentará a continuación, se ha seguido un protocolo establecido por investigaciones anteriores en el grupo.

Tras el lisado de las células, se baja el pH a 4 para inducir la precipitación de las proteínas ácidas a una temperatura de 4°C; con esto se consigue que precipiten proteínas ácidas, mientras que la proteína de interés se mantiene soluble debido a trabajar con una temperatura menor que su temperatura de transición.

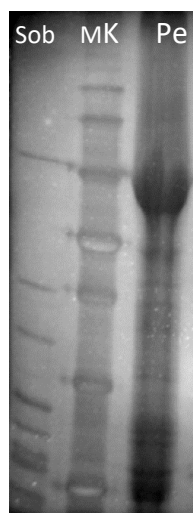
Se centrifuga a altas revoluciones y se observa por electroforesis en que porción se encuentra en mayor proporción la proteína. (Figura 15)



*Figura 15: Electroforesis en gel de poliacrilamida del sobrenadante y pellet tras la sonicación. En la primera calle se tiene el sobrenadante, seguido del pellet y marker.*

Como se observa en la figura 13, la proteína de interés se encuentra en mayor proporción en el sobrenadante, por lo que se va a seguir trabajando con él.

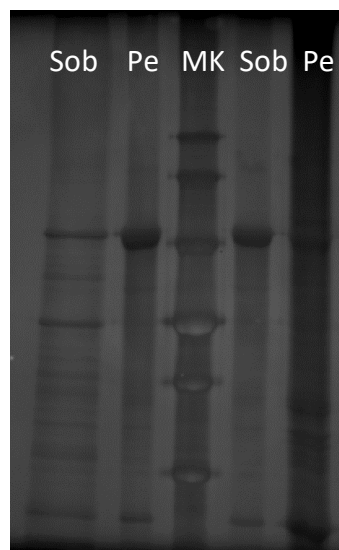
Atendiendo al apartado 4.2.6, se calienta el sobrenadante dos horas y se centrifuga en caliente durante 15 minutos para que la proteína precipite, debido a superar su temperatura de transición, por lo que por la propiedad de transición inversa con la temperatura, el polímero se encuentra en su forma agregada. (Figura 16)



*Figura 16: Electroforesis en gel de poliacrilamida. En la primera calle se presenta el sobrenadante, seguida del Marker y el pellet.*

Se observa y confirma que el polímero se encuentra en mayor proporción en el pellet.

El precipitado se resuspende en tampón Tris-base, dejándose en agitación en frío para solubilizar la proteína y posteriormente centrifugarlo. Al sobrenadante se le añade NaCl y se calienta durante dos horas con la finalidad de que el polímero precipite (lo que se confirma en las dos primeras calles de la Figura 17); se centrifuga y el precipitado se resuspende en agua ultrapura, se agita toda la noche en frío para disolver de nuevo la proteína (lo que se reafirma en las dos últimas calles de la Figura 17).



*Figura 17: Electroforesis en gel de poliacrilamida del seguimiento de la purificación.*

Con esto se llega a polímero puro que se ha liofilizado durante 3 o 4 días obteniéndose el biopolímero (EI)<sub>2</sub> puro, como se puede observar en la figura.

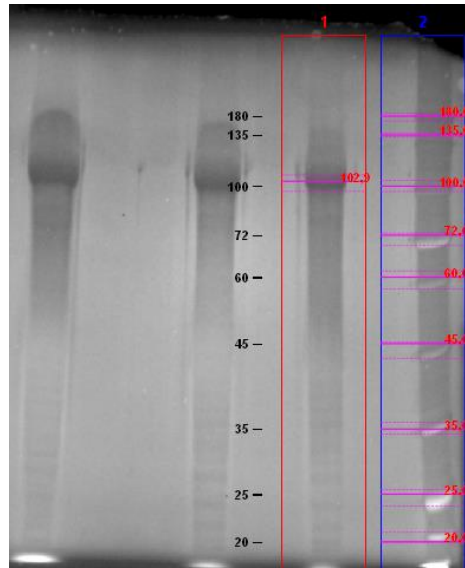


Figura 18: Electroforesis en gel de poliacrilamida del biopolímero recombinante  $(EI)_2$  puro.

En la figura 18 se puede observar que el biopolímero  $(EI)_2$  se encuentra lo suficientemente puro y además sufre un retardo electroforético por su naturaleza hidrofóbica debido a que el peso experimental de la electroforesis es de 102,9 kDa.

## 5.5. Caracterización del biopolímero recombinante $(EI)_2$

### 5.5.1. Espectrometría de masas (MALDI-TOF)

Se ha obtenido el espectro de masas con la finalidad de corroborar el peso molecular del polímero  $(EI)_2$ . Así, en la figura 18 se puede observar un pico mayoritario promedio de 95415,33 Da correspondiente al peso molecular experimental del polímero. Se ha obtenido por tanto un error del 2,40% respecto a la masa teórica de 93176 Da, que puede ser atribuible al error inherente de la técnica cuando analiza moléculas de tales dimensiones, por lo que puede considerarse un valor adecuado.

Además, se puede observar un segundo pico de menor intensidad de 47659 correspondiente probablemente a la segunda ionización del polímero, que presenta aproximadamente la mitad de intensidad que el pico mayoritario, e incluso se podría ver la tercera ionización.

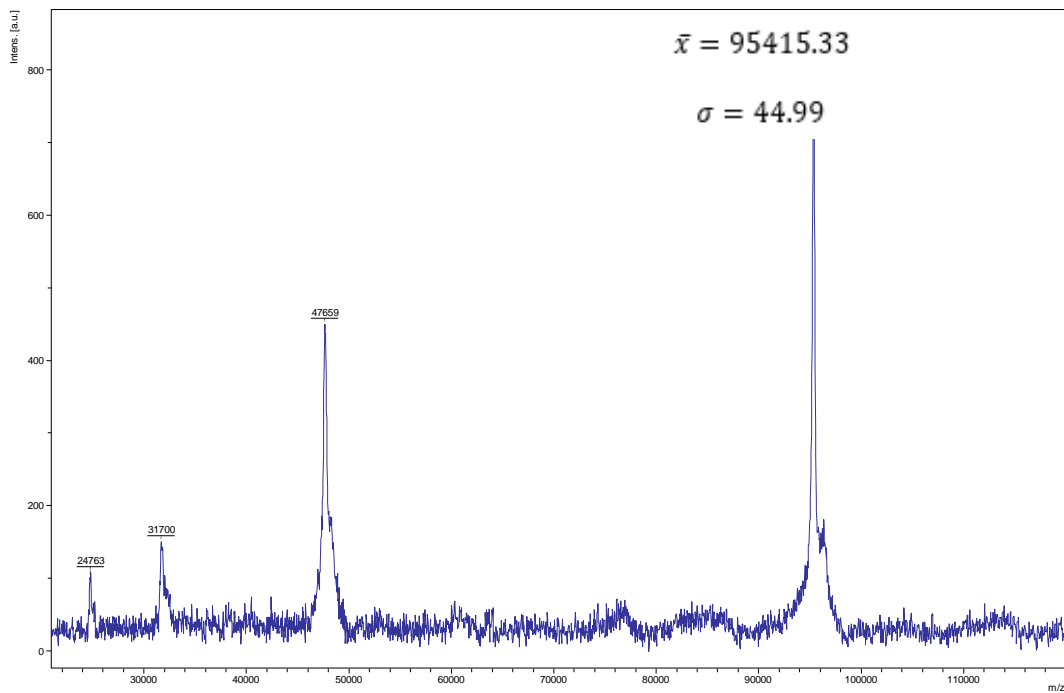


Figura 19: Espectro de masas MALDI-TOF del polímero  $(EI)_2$  en agua MQ.

Con esto se puede corroborar que en la figura 18, el polímero sufre retardo electroforético en la SDS-PAGE por dar un peso molecular superior (102,9 kDa) que el real obtenido en el espectro de masas MALDI-TOF (95415,33 Da). Este retardo electroforético es debido a que el polímero es mayoritariamente hidrofóbico y su movilidad electroforética se ve alterada, como ha podido observarse en otros ensayos publicados.

### 5.5.2. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Con objeto de corroborar la composición química del polímero se realizó el análisis por RMN de la disolución del polipéptido. En el espectro de la figura 20, se muestra el espectro de Resonancia Magnética Nuclear de protón del biopolímero  $(EI)_2$  a una temperatura de 5°C. Para realizar el espectro se disolvió el polímero en  $D_2O$  en una concentración de 10 mg/mL.

En primer lugar se muestran entre 0,4 y 0,6 ppm los metilos correspondientes a las valinas, isoleucinas y leucinas del polímero. Entre 1,5 y 2,0 ppm se representan señales características de  $-CH_2$  de las prolinas (cabe destacar que los hidrógenos son diastereotópicos). Entre 3,3 y 4,3 ppm resuenan las señales de los  $-CH$  de la cadena principal

de los aminoácidos. Por último, las señales entre 7,3 y 8,4 ppm corresponden a los hidrógenos del grupo amino de cada aminoácido.

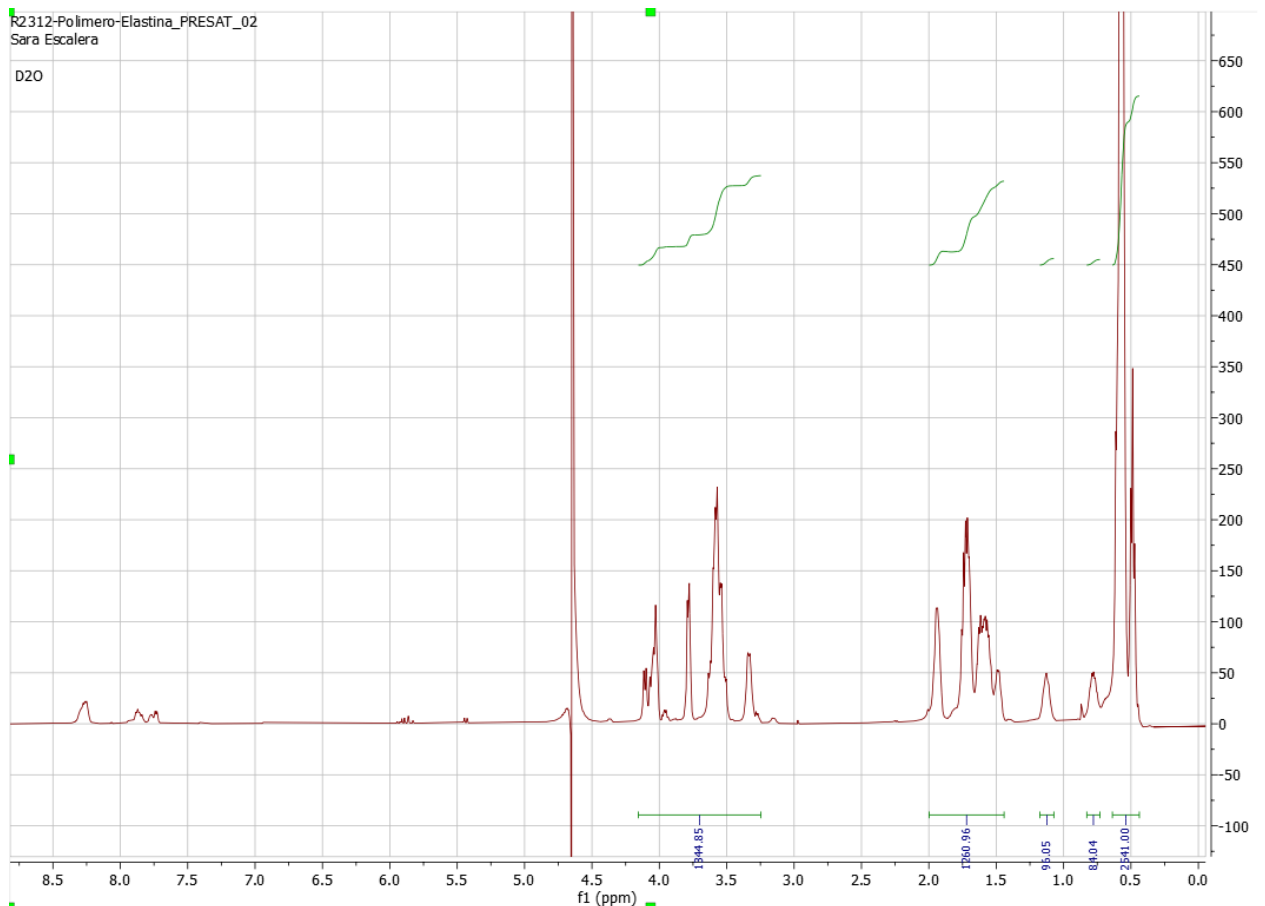


Figura 20: Espectro de Resonancia Magnética Nuclear  $^1\text{H}$ .

Con todo esto se puede corroborar que el espectro obtenido corresponde al biopolímero (EI)<sub>2</sub>.<sup>16</sup>

### 5.5.3. Espectroscopía DLS (Dynamic Light Scattering)

Se ha medido el tamaño de las partículas resultantes del biopolímero (EI)<sub>2</sub> a 4 °C (figura 21) y a 40 °C (figura 22) con la finalidad de observar el cambio de conformación debida al aumento de la temperatura por encima de la temperatura de transición del polímero, que según la bibliografía es de 15 °C para el bloque derivado del aminoácido Isoleucina. Con esto cabría esperar una conformación extendida y desordenada a una temperatura inferior a la temperatura de transición, con un tamaño molecular de partícula; y, una conformación



plegada y ordenada al superar los 15 °C, dando un tamaño muy superior de partícula debido a la agregación molecular.

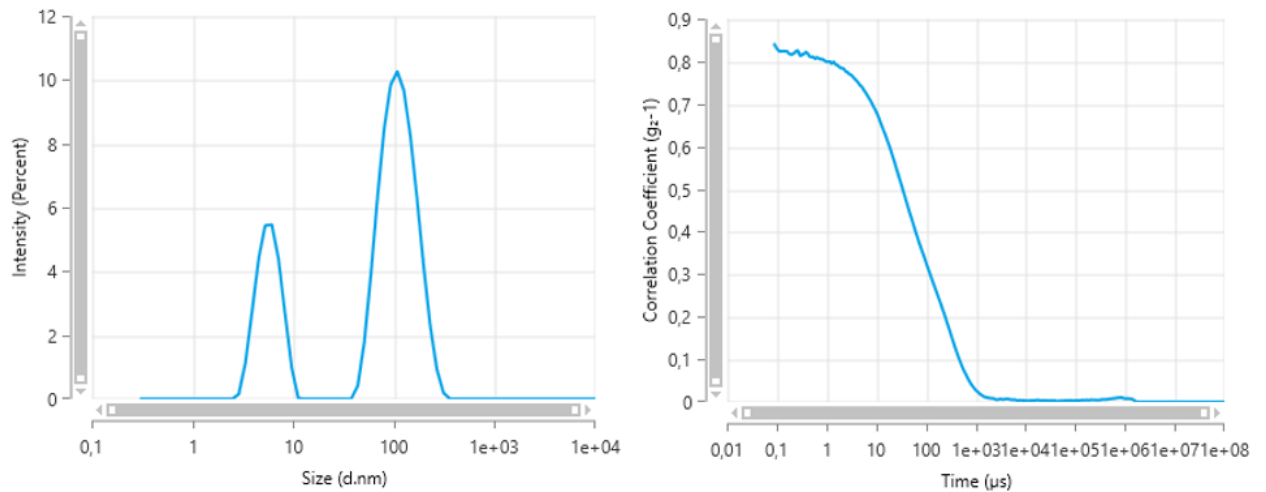


Figura 21: Gráfico de la intensidad y el coeficiente de correlación para el polímero (EI)<sub>2</sub> a 4 °C. En la figura de la izquierda se representa el porcentaje de cada pico respecto a su tamaño. En la figura de la derecha se representa el coeficiente de correlación respecto al tiempo.

Como se puede observar en la figura 21, existe a 4°C dos picos correspondientes a las dos conformaciones del biopolímero (EI)<sub>2</sub>: el primer pico correspondiente a la conformación extendida del polímero con un tamaño de molécula de 5,86 nm; y, un segundo pico correspondiente a la conformación plegada que se está agregando del biopolímero con un tamaño de partícula de 118,40 nm.

Además, el gráfico de la derecha nos muestra un coeficiente de correlación de aproximadamente 0,85, lo que indica una buena medición aunque el elevado PDI (Índice de Polidispersidad) de 1,067 es debido a la presencia de ambas estructuras

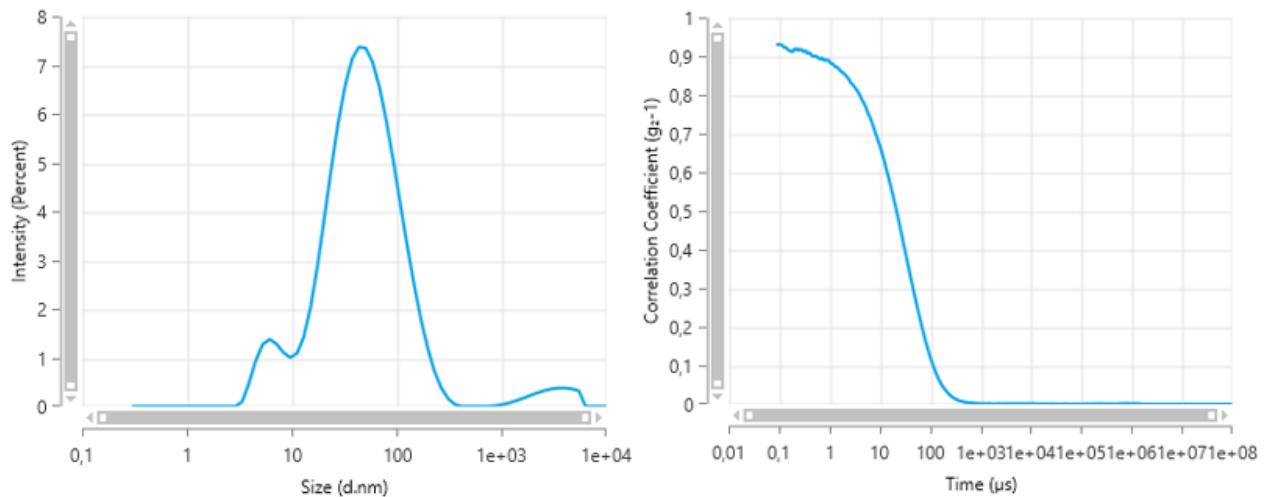


Figura 22: Gráfico de la intensidad y el coeficiente de correlación para el polímero (EI)<sub>2</sub> a 40 °C. En la figura de la izquierda se representa el porcentaje de cada pico respecto a su tamaño. En la figura de la derecha se representa el coeficiente de correlación respecto al tiempo.

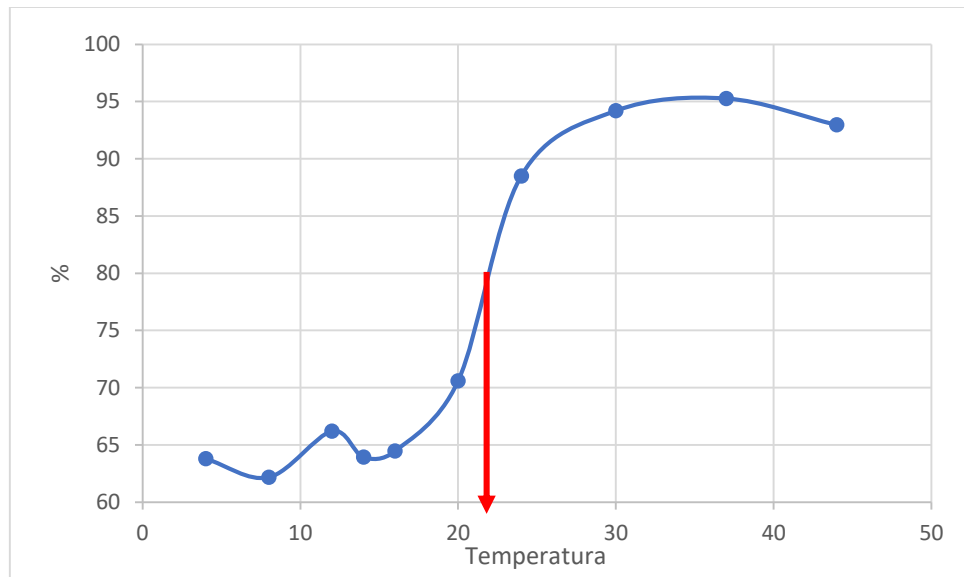
En la figura 22 se analiza la misma muestra sometida a una temperatura de 40°C, donde se observa un cambio en la intensidad de los picos respecto con la medición a 4°C, se puede observar aún el pico correspondiente a la forma molecular del polímero con un diámetro de 6,504 nm en una intensidad muy inferior al ensayo anterior, y también el pico de mayor tamaño con una intensidad muy superior y con un diámetro de 58,10 nm. Por tanto se puede concluir que el aumento de la temperatura ha producido un aumento del índice de agregación molecular del polímero en concomitancia con una disminución del tamaño de la nanopartícula (desde 118nm a 58nm) debido a una mayor compactación del polímero y de la nanopartícula que forma.

También se muestra la curva de correlación correspondiente un coeficiente de correlación cercano a 1, lo que indica una buena correlación, y además nos permitió extraer un PDI de 0,4279, lo que concuerda con la existencia de un solo pico.

Además, se realizó una rampa de temperatura de 4 a 40 °C para visualizar el cambio de conformación del polímero con la temperatura. Con esto se consigue visualizar la temperatura de transición del bloque hidrofóbico exclusivamente, pues en condiciones fisiológicas (como las actuales) el bloque hidrofílico no presenta temperatura de transición

en este rango debido a que el ácido glutámico tiene una temperatura de transición de aproximadamente 70 °C (Figura 23)

Así, se observa que la temperatura de transición del bloque hidrofóbico del polímero según la técnica de DLS es de aproximadamente 22°C.



*Figura 23: Seguimiento del porcentaje de intensidad de la nanopartícula en función de la temperatura para visualizar la temperatura de transición del polímero.*

Por último, se ha analizado la carga superficial de las nanopartículas midiendo el potencial zeta a 37 °C (figura 24) dando un valor de -17,69 mV. Este valor negativo corrobora la formación de micelas con el bloque hidrofílico basado en el ácido glutámico situado en la corona de la nanopartícula y nos permite hablar de nanopartículas de alta estabilidad.

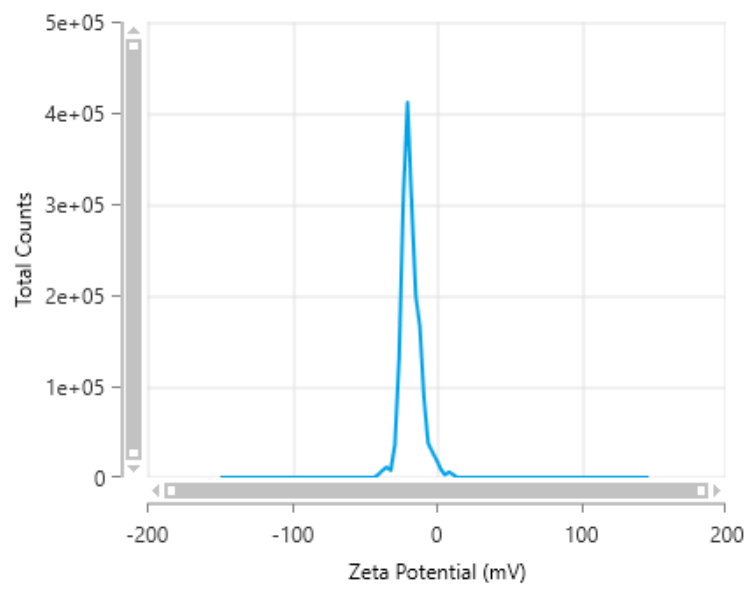


Figura 24: Grafico del potencial zeta para la visualización de la carga superficial del polímero.

## 6. CONCLUSIONES.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto a lo largo del presente trabajo de investigación, cabe destacar las conclusiones que se detallan a continuación.

En primer lugar, la producción de dos biopolímeros similares a la elastina,  $(KI)_2$  y  $(EI)_2$ , a partir de los plásmidos de expresión proporcionados por el grupo de investigación, para aplicaciones biomédicas debido a su capacidad de formar nanoestructuras anfifílicas, pudiéndose utilizar como vehículos de fármacos.

En segundo lugar, la diferencia significativa a la hora de purificar un tipo de polímero u otro. El polímero  $(EI)_2$  ha sido fácilmente purificable por su gran solubilidad debido a los grupos carboxilo del ácido glutámico, a diferencia del biopolímero  $(KI)_2$ , que aun utilizando diferentes técnicas, no se ha conseguido purificar debido a su mala solubilidad. Además, esta diferencia de polímeros también difiere en su aplicabilidad en el campo biomédico.

Debido a que no se ha conseguido purificar adecuadamente el polímero  $(KI)_2$ , solo se ha caracterizado el biopolímero  $(EI)_2$  mediante técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida, cromatografía de exclusión por tamaños, espectrometría de masa MALDI-TOF, Espectroscopía de Resonancia magnética nuclear (RMN) y Espectroscopía DLS (Dynamic Light Scattering), donde se ha podido comprobar la existencia del polímero, así como su peso molecular exacto, el tamaño de partícula y, su carga superficial.

## 7. BIBLIOGRAFÍA.

1. Guillén, M. V. L. (2009). Estructura y propiedades de las proteínas. Obtenido de [http://www. uv. es](http://www.uv.es): [http://www. uv. es/tunon/pdf\\_doc/proteinas\\_09. pdf](http://www. uv. es/tunon/pdf_doc/proteinas_09. pdf). 34p.
2. Guerrero, L. A. C., Ríos, L. C., & Ancona, D. A. B. (2003). Estructura y propiedades funcionales de proteínas de leguminosas. *Revista de la Universidad Autónoma de Yucatán*, 227, 34-43.
3. SANTUCHO CORDOBA, M. A. Proteínas.
4. Branden, C., & Tooze, J. (1999). Introduction to protein structure (2nd ed.). New York: Garland Publishing.
5. Sarah Rauscher, Régis Pomès (2017) The liquid structure of elastin eLife 6:e26526.
6. Mithieux, S. M., & Weiss, A. S. (2005). Elastin. *Advances in protein chemistry*, 70, 437–461. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(05\)70013-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(05)70013-9).
7. Perticaroli, S., Ehlers, G., Jalarvo, N., Katsaras, J., & Nickels, J. D. (2015). Elasticity and Inverse Temperature Transition in Elastin. *The journal of physical chemistry letters*, 6(20), 4018–4025. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.5b01890>
8. Juan Gonzalez-Valdivieso, Alessandra Girotti, Raquel Muñoz, J. Carlos Rodriguez-Cabello, and F. Javier Arias. Self-Assembling ELR-Based Nanoparticles as Smart Drug-Delivery Systems Modulating Cellular Growth via Akt. *Biomacromolecules* 2019, 20, 5, 1996-2007. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.biomac.9b00206>
9. Jordi Guillem-Martí, Elia Vidal, Alessandra Girotti, Aina Heras-Parets, Diego Torres, Francisco Javier Arias, Maria-Pau Ginebra, Jose Carlos Rodriguez- Cabello and Jose María Manero. Functionalization of 3D-Printed Titanium Scaffolds with Elastin-like

Recombinamers to Improve Cell Colonization and Osteoinduction. *Pharmaceutics* 2023, 15(3), 872; <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030872>

10. Fernández-Colino, A., Girotti, A., López, M. I., Arias, F. J., & Rodríguez-Cabello, J. C. (2011). Los polímeros tipo elastina y su utilización como tags para la purificación de proteínas. *Biomecánica*, 19(1), 8-16.

11. Girotti, A. (2007). Desarrollo de una plataforma biotecnológica para la obtención de polímeros recombinantes tipo elastina (Doctoral dissertation, Universidad de Valladolid).

12. Gutiérrez Bouzán, M. C., Burdó Expósito, A., & Cegarra Sánchez, J. (2009). La cromatografía de exclusión: análisis de la distribución de pesos moleculares en siliconas por GPC. *Boletín Intexter del Instituto de Investigación Textil y de Cooperación Industrial*, (135), 33-40.

13. [https://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es\\_ES/investigacion/cromatografia/espectrometria\\_de\\_masas.pdf](https://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/espectrometria_de_masas.pdf). Consultado por última vez el 17 de Mayo de 2023.

14. Harris, RK y Wasylishen, RE (Eds.). (2020). Técnicas de espectroscopia de RMN (2ª ed.). Real Sociedad de Química.

15. <https://www.protpi.ch/>. Consultado por última vez el 30 de Mayo de 2023.

16. Vallejo Vicente, R. (2022). Encapsulación de fármacos hidrófobos con recombinantes similares a elastina mediante un proceso antisolvente supercrítico para aplicaciones biomédicas avanzadas. (Tesis Doctoral, Universidad de Valladolid)