

Biomecánica, 17 (1), 2009, pp. 15-27

Obtención de un polímero de tipo Elastina modificado con secuencias Bioactivas y Biodegradables, para su aplicación en ingeniería

Accésit a la Mejor Comunicació del XXXI Simposio de la Sociedad Ibérica de Biomecánica y Biomateriales

C. GARCÍA-ARÉVALO, A. GIROTTI, F.J. ARIAS, S. MARTÍN, I.M. LÓPEZ, J.C. RODRÍGUEZ-CABELLO.
G.I.R. BIOFORGE. Universidad de Valladolid, Centro de I+D.
CIBER-BBN. Networking Research Center on Bioengineering,
Biomaterials and Nanomedicine. Valladolid.

Resumen

La matriz extracelular es uno de los principales elementos reguladores de la actividad celular. Los diferentes módulos de las macromoléculas que la componen son capaces de desencadenar señales que activan diferentes rutas intracelulares que organizan las funciones vitales de las células. La ingeniería de tejidos se dedica a desarrollar sistemas capaces de imitar, temporalmente, el comportamiento de la matriz extracelular con objeto de promover la regeneración o el reemplazo de tejidos y órganos dañados, actuando como un soporte atractivo para las células que deben adherirse y crecer sobre ella, hasta reemplazarla por tejido sano. En este trabajo se describe el proceso de diseño y producción de un polímero de tipo elastina que se ha funcionalizado con secuencias bioactivas que añaden actividades específicas al andamio o soporte celular que constituye la elastina. Así, algunos dominios elastoméricos se modificaron con el aminoácido lisina para poder entrecruzar las moléculas de polímero y conseguir matrices. También se incluyó la secuencia REDV, presente en el dominio CS5 de la fibronectina humana, como motivo de adhesión celular. Por último, el polímero se funcionalizó con secuencias diana de enzimas proteolíticas para mejorar su bioprocabilidad.

Palabras clave: ECM, ELPs, bioproducción, REDV, Biomateriales, Ingeniería de tejidos entrecruzamiento, bioprocabilidad.

Abstract

Extracellular matrix (ECM) is a major component for the regulation of cell activity. The different modules of the proteins which constitute the extracellular matrix macromolecules represent for the cells which enter in contact with them, new signals capable of activating several intracellular signaling pathways, resulting in the modulation of numerous cell functions. Tissue engineering tries to develop new materials based on these components as scaffolds for cells to promote their adhesion and growth. In this work, genetic engineering techniques were used to design and biosynthesize an extracellular matrix analogue based in the elastin component. The structural base of our scaffold is an elastin-derived sequence which confers an adequate mechanical behavior. In addition, several domains were included, for adding new bioactivities to this elastin-like polymer (ELP). Some of these elastic domains were modified to contain lysine for cross linking purposes. The polymer also contained periodically spaced fibronectin CS5 domain enclosing the well known cell attachment sequence REDV. Finally, the polymer had target sequences for proteolytic action.

Keywords: ECM, ELPs, bioproduction, REDV, Biomaterials, Tissue engineering, cross linking, bioprocability.

Correspondencia:

G.I.R. BIOFORGE.

Universidad de Valladolid. Centro de I+D

Paseo de Belén s/n. Valladolid, 47011. Spain

Email: roca@bioforge.uva.es

Introducción

Los productos proteicos ofrecen la posibilidad de crear materiales poliméricos de prestaciones únicas con características físico-químicas, propiedades mecánicas y topología precisas, variando la secuencia de las unidades aminoacídicas que los componen. Su privilegiada naturaleza les convierte en candidatos idóneos en la moderna ciencia de los biomateriales. La tendencia actual en el diseño de los biomateriales más avanzados consiste en añadir elementos activadores de la regeneración del tejido en que son implantados, capaces de promover interacciones específicas con la superficie celular y/o con la matriz extracelular [1]. A tal fin, se están estudiando y desarrollando nuevas estructuras que integran y combinan dominios de naturaleza proteica, dominios reguladores de las rutas de señalización interna y del desarrollo celular [2].

La naturaleza proteica de algunos biomateriales permite, además, hacer uso de la precisa maquinaria de determinados organismos vivos, como alternativa a la síntesis química, para obtener polímeros de peso molecular concreto, secuencia aminoacídica definida, reproducible y con un elevado grado de complejidad a un coste de producción muy bajo. La bio-producción o biosíntesis se hace posible gracias a las herramientas que proporciona la ingeniería genética, y a la interdisciplinariedad de la ciencia de materiales. No obstante, la síntesis de polímeros peptídicos que no existen como tales en la naturaleza se enfrenta al inconveniente de tener que diseñar genes sintéticos estables codificantes de secuencias de aminoácidos muy repetitivas. La expresión de estas en un sistema heterólogo conlleva algunos problemas.

A diferencia de la síntesis química, en que se genera directamente el producto final requerido, la biosíntesis en organismos transformados requiere un paso previo e ineludible de síntesis del gen artificial codificante del polipéptido recombinante. La etapa inicial de todo el proceso de fabricación (síntesis del gen) se realiza *in vitro*, en el laboratorio, mientras que las etapas sucesivas de transcripción del gen y traducción del RNA mensajero resultante, son ejecutadas por los organismos vivos elegidos. Las etapas *in vivo* se

benefician de la extraordinaria capacidad tecnológica de organismos vivos tan sencillos como las bacterias y los virus. El perfeccionamiento en las técnicas microbiológicas y biotecnológicas para incrementar el nivel de expresión del producto diseñado, durante el cultivo de estos organismos transformados, permite obtener, cada vez, rendimientos de producción superiores.

El diseño de genes que incorporan de forma precisa y controlada secuencias bioactivas de interés, permite obtener productos en que se consigue un control absoluto de su composición y arquitectura, con motivos de gran complejidad presentes en algunas proteínas naturales [3]. El polímero proteico recombinante reunirá, idealmente, todas las propiedades de cada uno de los bloques funcionales incluidos.

Uno de los principales objetivos que se persiguen en el desarrollo de biomateriales destinados a reparar o reemplazar tejidos y órganos dañados, es el de imitar el comportamiento de la matriz extracelular, que constituye uno de los principales elementos moduladores de la actividad celular. La matriz extracelular no es un elemento estructural pasivo, sino que está sometida a un proceso de remodelación continuo, que favorece la adecuada interacción de las células con su entorno más inmediato, regulando así procesos tales como la forma, adhesión, proliferación, migración, diferenciación y supervivencia. La composición y la organización estructural de la ECM es, por tanto, un aspecto crucial para que tales procesos se desarrollen de forma adecuada [4], [5], [6].

Los polímeros biodegradables tienen un gran interés para la elaboración de substratos que imitan la estructura de la ECM y proporcionan una guía temporal a las células durante la reparación y regeneración de un tejido dañado. Idealmente, deben servir de soporte celular y desaparecer en un tiempo predecible, sin afectar negativamente al tejido regenerado. El empleo de tales substratos debe cumplir, por tanto, con los requisitos de biocompatibilidad (el material implantado no debe ser rechazado por el organismo al que se implanta), bioactividad (debe promover la reparación y/o regeneración de la zona afectada) y biofuncionalidad (el tejido regenerado debe ser capaz de ejercer las funciones que le son propias). [7].

Los polímeros tipo elastina (ELPs) son polipéptidos sintéticos compuestos de secuencias repetidas presentes en la Elastina como poli(VPG), poli(VPGG), poli(GVGVP), poli(IPGVG), poli(VAPGVG). Algunos ELPs se caracterizan por tener un «comportamiento inteligente» que se basa en el fenómeno de la transición inversa, es decir, la transición desde un estado desordenado a uno ordenado, al incrementar la temperatura de la disolución en que se encuentran. A bajas temperaturas el polímero se encuentra en conformación extendida y los restos apolares de las cadenas laterales de los aminoácidos están sometidos a hidratación hidrófoba, rodeados de moléculas de agua que se estructuran en clatratos. Al aumentar la temperatura, los clatratos se rompen por la agitación térmica, permitiendo las interacciones hidrófobas entre los restos apolares de la cadena que, al plegarse, se «ordena». El proceso comienza con la formación de la conformación denominada horquilla o giro β y, posteriormente, el empaquetamiento de las horquillas β obliga al polímero a adoptar una disposición helicoidal, la denominada espiral β . La disposición en espiral hace que quede en el interior un canal hidrófilo y deja los grupos apolares en la zona exterior, que al autoensamblarse generan micro y macropartículas que segregan en la disolución y en algunos casos sedimentan, dando lugar a una fase densa y pegajosa. Todo este proceso es completamente reversible y, al contrario que en la mayoría de los sistemas físicos, la fase desordenada \rightarrow orden, se produce al aumentar la temperatura. Esta transición inversa, puede cuantificarse por turbidimetría o calorimetría diferencial de barrido, siendo la temperatura a la que se produce el cambio, la temperatura de transición [8], [9], [10].

Los biopolímeros de tipo elastina obtenidos mediante expresión heteróloga, reproducen la extraordinaria elasticidad de la elastina y permiten incorporar de forma precisa y controlada secuencias de adhesión celular, secuencias entrecruzantes y secuencias diana de enzimas proteolíticas que mejoren su perfil activo y la degradación del armazón molecular que generan. Todo ello unido a su extraordinaria biocompatibilidad, la producción recombinante a partir de fuentes renovables, su comportamiento

inteligente y sus propiedades mecánicas les dota de un perfil muy apto para el fin que se propone, que es conseguir biomateriales funcionalizados que imiten el comportamiento de la matriz extracelular [11], [12].

Materiales y métodos

Materiales

Para la fase in vitro de diseño del gen artificial, síntesis y transformación de las bacterias con el mismo se emplearon: oligonucleótidos sintéticos de IBA GmbH (Goettingen, Alemania), Pfu turbo DNA polimerase recombinante, *Taq* DNA polimerasa y enzima de restricción *Eam* 1104 I de Stratagene HDI (Sigma Aldrich). Las enzimas de restricción *Xba* I, *Hind* III *Dpn*I, *Eco*RI, y *Sap* I eran de Fermentas (Burlington, ON). T4 DNA ligasa, Fosfatasa alcalina de camarón (S.A.P) y fosfatasa alcalina Antarctic de NewEngland Biolabs. Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo en un termociclador Perkin-Elmer GeneAmp 2400. Las imágenes de los geles se capturaron con una cámara digital Kodak DC-120. La fase de producción in vivo en organismos genéticamente transformados empleó *Escherichia coli* cepa BLR (DE3) y el vector de expresión pET (25+) de Novagen (Madison WI), Ampicilina de Apollo Scientific (Bredbury, UK). Para la fase de inducción y producción del polímero se empleó Isopropil-1-tio- β -D-Galactopiranosido (IPTG) de Apollo Scientific. El entrecruzamiento para la obtención de hidrogeles se hizo con Diisocianato de Hexametileno (HDI) de Sigma Aldrich.

Construcción del gen sintético

Para la biosíntesis del polímero se emplearon protocolos estándar de biología molecular y de tecnología del DNA recombinante.

El gen del monómero repetitivo se creó mediante amplificación por PCR de 2 oligonucleótidos sintéticos de 148 y 162 nucleótidos, denominados FIBR ELAST-for y FIBR ELAST-rev respectivamente. Cada oligonucleótido contenía tres zonas funcionales: una zona de hibridación en el extremo 3' complementaria a la zona de hibridación del otro oligonucleótido, una zona central codificante del polímero y un sitio de restricción *Eam* 1104 I en

el extremo 5' (negrita). De esta forma, los oligonucleótidos actuaron como cebadores y molde de PCR al mismo tiempo.

FIBR ELAST - for

5'ACCACTCTTCAGTACCGGGCATCGG
TGTTCCGGGCATTGGTGTGCCGGGCAA
AGGTGTTCCGGGCATTGGTGTGGCCGGC
ATTGGTGAAGAAATCCAGATCGGGCAT
ATCCCACGCGAGGATGTGGACTACCAC
CTGTATCCGGTGCC **3'**,

FIBR ELAST - rev

5'ACCACTCTTCTTACACCCGGTGCAA
CGCCACACCCGGGGCAACGCCACAC
CCGGCGCAACGCCAGGGGCAACGCC
ACACCCGGCGCAACGCCACTTTGCC
GGAACACCAATGCCCGGCACACCAATG
CCTGGCACCGGATACAGGTGGTAGTCC
3'.

La concatenación de las piezas monoméricas, se basó en la técnica de clonaje «seamless»

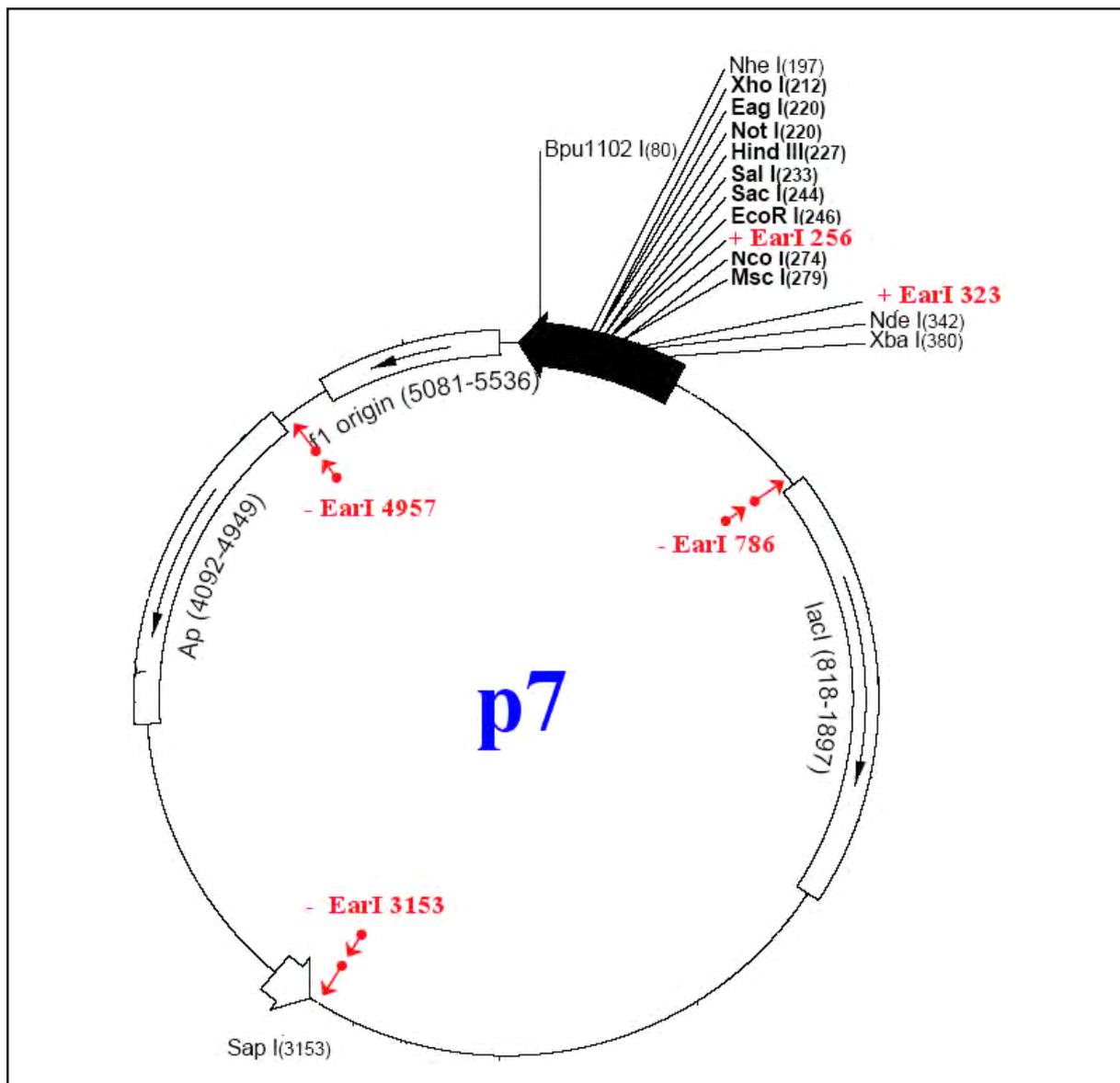


Figura 1. Vector de expresión p7. Para realizar la síntesis de un vector plasmídico idóneo para la clonación y expresión de polímeros se modificó parte de la secuencia del vector de expresión pET 25 b+ (Novagen), que contiene la secuencia reconocida por la endonucleasa elegida en este trabajo *Ear* I en tres sitios. Mediante mutagénesis sitio-dirigida, se mutaron estos 3 sitios endógenos de reconocimiento de la endonucleasa *Ear* I, CTCTTCN'NNN_, (isosquizómero *Eam*1104 I) y se le proporcionaron otros dos nuevos en la región de clonaje.

(literalmente «clonaje sin costuras»). El producto de la concatenación se clonó en un plásmido de amplificación génica (p8). Los clones positivos se seleccionaron por PCR con enzima *Taq* polimerasa y digestión enzimática diagnóstica con *Xba* I y *Hind* III. A continuación se subclonaron en el vector de expresión p7, modificado mediante mutagénesis del pET25b (+) para ser utilizado en este trabajo. (Fig.1)

Producción y purificación del polímero recombinante REDV

La producción del polipéptido recombinante se inició inoculando una colonia aislada, en medio LB con los antibióticos de resistencia, a 37° C y agitación a 250 rpm. El crecimiento se prolongó hasta que la densidad óptica del cultivo fue de $DO_{600} = 0,6$. En este momento se indujo la expresión del polipéptido recombinante añadiendo IPTG a una concentración final de 1 mM y se mantuvo a la temperatura adecuada durante 4-24 h.

Purificación del polímero recombinante REDV

A) Fraccionamiento de las bacterias. Una vez terminada la inducción se bloqueó el crecimiento y el metabolismo de las bacterias enfriándolas a 4° C. Se lavó el cultivo y se resuspendieron las células en solución TE (25 mL/L de cultivo) en presencia de inhibidores de proteasa. Las bacterias se lisaron en un sonicador (Sonicator 3000 de Misonix, New York). Tras centrifugar a 15000xg durante 60 minutos a 4° C se separó el sedimento o fracción insoluble total y el sobrenadante que constituye la fracción soluble total donde se encontraba disuelto el polímero recombinante.

B) Purificación del polímero. La purificación del polímero se llevó a cabo por segregación reversible dependiente de temperatura, aprovechando la naturaleza inteligente y el fenómeno de transición de fase específica, característica de estos polímeros. La fracción soluble de las bacterias, se acidificó hasta un pH de 3,5. El material precipitado tras la acidificación, que no contenía el polímero se retiró por centrifugación. La precipitación del polímero se consiguió calentando la muestra a 70° C durante 2 horas. El precipitado se separó por centrifugación

a 15000xg durante 20 minutos a 40° C. Tras resuspender el polímero en agua fría de tipo I, en una proporción de 2 mL/L de cultivo bacteriano, con agitación constante, durante 12 horas, se repitió la operación 2 veces más.

Después de tres ciclos de purificación, el polímero disuelto se dializó en agua estéril tipo I a 4° C, posteriormente se liofilizó y finalmente se conservó a -20° C.

Electroforesis en geles de acrilamida en condiciones desnaturalizantes

Tanto el proceso de producción como el de purificación, se fueron monitorizando con geles de acrilamida, en presencia de Dodecil Sulfato Sódico (SDS) en un «MiniVE vertical electrophoresis system» de Hoefer. El porcentaje de acrilamida en los geles separadores fue del 12%. La tinción de los geles tras la separación electroforética se llevó a cabo en una solución de Azul de Coomassie. Para la determinación del peso molecular relativo se utilizaron marcadores de masa molecular conocida.

Caracterización física

A) Turbidimetría: La pérdida de transparencia de la disolución del polímero debida a la transición de fase al incrementar la temperatura, se evaluó midiendo los cambios de absorbancia a 300 nm de la disolución de polímero a una concentración de 50 mg/ml a pH 7,02 en un espectrofotómetro UV-Vis Varian Cary 50 con lámpara de Xenón, equipado con una cámara porta-muestras termostatazada.

B) Calorimetría diferencial de barrido (DSC): Los experimentos de DSC se llevaron a cabo en un Mettler Toledo 822e, equipado con un sistema de refrigeración con nitrógeno líquido, a partir de una disolución de polímero purificado en tampón fosfato, a una concentración de 50 mg/ml y pH 7,2. Se hizo un barrido de temperaturas desde los 5 a los 90° C, a una velocidad de 5°/min. La temperatura y la entalpía se calibraron con una muestra estándar de Indio.

Obtención de matrices

A partir del polímero de tipo elastina purificado se sintetizaron matrices sólidas de tipo hidrogel, ensayando diferentes concentraciones del agente

entrecruzante Diisocianato de Hexametileno (HDI) en disolvente DMSO. Los hidrogeles obtenidos, se lavaron mediante diálisis y se almacenaron en agua destilada tipo I a 4° C. Se ensayaron diferentes relaciones molares del entrecruzante y de lisinas presentes en el polímero de elastina, para conseguir matrices con diferentes tamaños de poro.

Resultados y Discusión

El polímero proteico que se analiza en este trabajo se diseñó con idea de obtener un biomaterial avanzado, capaz de imitar temporalmente la estructura de la matriz extracelular o, al menos, parte de la misma, para su empleo en la regeneración de tejidos. Se le dotó de una secuencia peptídica basada en la repetición periódica de 4 bloques funcionales, capaces de proporcionarle unas adecuadas propiedades mecánicas, permitir la obtención de matrices, promover la adhesión celular específica y su biodegradabilidad (Fig. 2).

El polímero de tipo elastina tenía que proporcionar una respuesta mecánica comparable a la de matriz extracelular natural, por eso la base del polímero se construyó a partir de un componente estructural primario de la misma, basado en la repetición de un dominio presente en la proteína elastina, de secuencia $(VPGIG)_n$ que permite articular un esqueleto en el que las células tienen un soporte donde crecer. Este pentapéptido aportó la elasticidad las cualidades mecánicas necesarias para sustentar el crecimiento celular [13], [14]. El comportamiento inteligente [13], [14], y la extraordinaria biocompatibilidad propias de los derivados de la elastina [15]. La inclusión de un aminoácido tan hidrofóbico como la Isoleucina redujo la temperatura de transición del polímero resultante a niveles inferiores a los de la

temperatura corporal. Esta reducción es especialmente necesaria para equilibrar el incremento esperado de la temperatura de transición debido a la naturaleza de los otros dos bloques del biopolímero. La sustitución introducida en el segundo bloque de la isoleucina por un aminoácido más hidrófilo y la incorporación en el tercer bloque de un motivo ajeno a la elastina teóricamente tienden a aumentar la T_t del polímero, lo cual, complicaría su purificación y su utilización en ingeniería de tejidos.

El segundo bloque usado, una variación del primero, contenía una lisina sustituyendo la isoleucina (VPGKG). La elección de este aminoácido tenía por objeto dotar al biopolímero de un grupo funcional que pudiera ser empleado en la modificación química post-traduccional del mismo. El grupo γ -amino de la lisina puede participar en la formación de entrecruzamientos intercatenarios sin modificar substancialmente las propiedades mecánicas de los polímeros tipo elastina [9], [16] así como en la funcionalización del polímero con otros compuestos químicos. La dependencia de su carácter más o menos polar con el pH, añadía un comportamiento sensible al cambio de este parámetro.

Flanqueado por los pentapéptidos elastoméricos descritos, se insertó el motivo peptídico REDV [17]. REDV está presente en el dominio CS5 de la fibronectina humana y se ha implicado en la adhesión específica y selectiva de las células endoteliales [18]. Sin embargo, la incorporación del tetrapéptido no es suficiente para crear bio-matrices adhesivas. Esto se debe a que la acción del motivo REDV se ve afectada por el entorno y la posición que ocupa en el polipéptido o en el sustrato. Presuntamente, los cambios en la secuencia primaria se reflejan en cambios conformacionales de los lazos peptídicos que

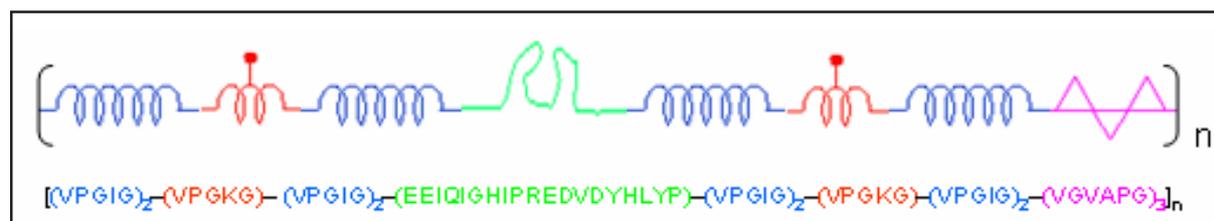


Figura 2. Representación esquemática de la secuencia monomérica del polímero REDV. Cada bloque funcional se ha representado con una forma y color diferente.

contienen los péptidos de adhesión causando un cambio en la avidéz por las integrinas. La secuencia completa del dominio consta de 20 aminoácidos, (EEIQIGHIPREDVDYHLYP). Hay evidencias de que este segmento, se une a la integrina $\alpha 4\beta 1$ y es capaz de promover la adhesión de las células endoteliales pero no la de las células de músculo liso ni la de las plaquetas. Su inclusión pretendía fomentar la adhesión de este tipo de células a la matriz extracelular sintética [19].

Por último, cada monómero contó con tres repeticiones de una secuencia presente en la elastina natural humana, diana de algunas elastasas específicas de la membrana extracelular, que hidrolizan sus enlaces peptídicos cuando la matriz debe renovarse o remodelarse. La elevada hidrofobicidad y el elevado grado de entrecruzamiento de las fibras de Elastina, una vez que las células la sintetizan y la depositan en la superficie celular, las convierte en componentes extremadamente duraderos que apenas experimentan turn-over (recambio) en los tejidos sanos (Se ha estimado que la elastina tiene una vida media de 70 años), a menos que se produzca una lesión o situación patológica. Son estructuras relativamente resistentes a la acción de las enzimas proteasas. Sin embargo, su digestión produce grandes cantidades de péptidos (que pertenecen a la familia de las matriquinas) y son degradadas fundamentalmente por proteinasas específicas como elastasas pancreáticas y leucocitarias, enzimas tipo-elastasa como las Metaloproteinasas (MMPs) (MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-12) y Catepsinas G, K y L [20].

La secuencia elegida, reconocida por las elastasas, el hexa-péptido VGVAPG, una vez liberada por la acción proteolítica manifiesta numerosas propiedades biológicas: promueve la quimiotaxis, estimula la degradación proteolítica (aparición de metaloproteasas), induce la organización en miofibrillas de la elastina, estimula la proliferación celular y es reconocida por el receptor celular de elastina-laminina [21], [22]. La inclusión de tres hexapéptidos consecutivos pretendía aumentar la eficiencia de la proteólisis [23], [24].

Dada la complejidad estructural del polímero diseñado, resultaba evidente que, su síntesis mediante los procedimientos químicos

convencionales no era la alternativa más adecuada, por lo que se optó por utilizar las herramientas de la ingeniería genética y de la biotecnología para su obtención, como ya se ha descrito en la sección experimental de materiales y métodos.

El diseño de genes que incorporan de forma precisa y controlada secuencias de interés y su incorporación en el material genético de determinados microorganismos (como bacterias o virus), permiten obtener productos en que se consigue un control absoluto de la composición y la arquitectura, con motivos de gran complejidad presentes en algunas proteínas naturales, y con rendimientos finales importantes, gracias al empleo de la maquinaria celular.

Los polímeros proteicos que se obtienen mediante técnicas de ingeniería genética dan lugar a suspensiones monodispersas y pueden tener un tamaño comprendido entre unos pocos cientos de Daltons hasta más de 200 kDa, siendo este límite superior progresivamente sobrepasado.

El gen del monómero se sintetizó mediante amplificación por PCR a partir de dos oligonucleótidos sintéticos de 148 y 162 nucleótidos denominados FIBR ELAST-for y FIBR ELAST-rev respectivamente. Para minimizar la posibilidad de amplificaciones inespecíficas, se utilizó la técnica de amplificación por PCR «touch down» en que los ciclos de amplificación van reduciendo progresivamente la temperatura de hibridación del cebador al molde.

Una vez controlada la secuencia del monómero, se realizó su ligación controlada o concatenación. Para ello se insertaron secuencias reconocidas por la endonucleasa *Eam* 1104 I, en la secuencia de los cebadores, en las extremidades del segmento que codifica el monómero proteico, cuyos cortes dieron lugar a extremidades complementarias pero no palindrómicas.

Una vez controlada la secuencia del gen monomérico se obtuvo el gen multimérico mediante la combinación en cadena aleatoria o concatenación de las piezas monoméricas. La concatenación se basó en la técnica de clonaje «seamless» (literalmente «clonaje sin costuras») con enzimas de restricción de tipo II, para aislar las secuencias nucleotídicas que codifican el monomero y conseguir la clonación direccional y consecutiva de segmentos de DNA.

Los productos de la ligación se subclonaron en el vector de amplificación génica p8 y los clones positivos se seleccionaron por PCR y digestión enzimática diagnóstica con enzimas de restricción. (Fig. 3).

Los procesos de concatenación, screening de colonias por PCR y producción en el vector de expresión p7, permitieron aislar diferentes clones capaces de producir un polímero de peso

molecular monodisperso, con n-mer repeticiones del monómero (desde n = 1 a n = 10). Aunque se analizaron y preservaron todas ellas, para este trabajo solo continuó con las que producían el polímero de mayor peso molecular, el decámero (n=10).

Tras la transformación de la cepa de expresión de *Escherichia coli* BLR (DE3) con el vector p7 clonado con el decámero, se indujo la expresión

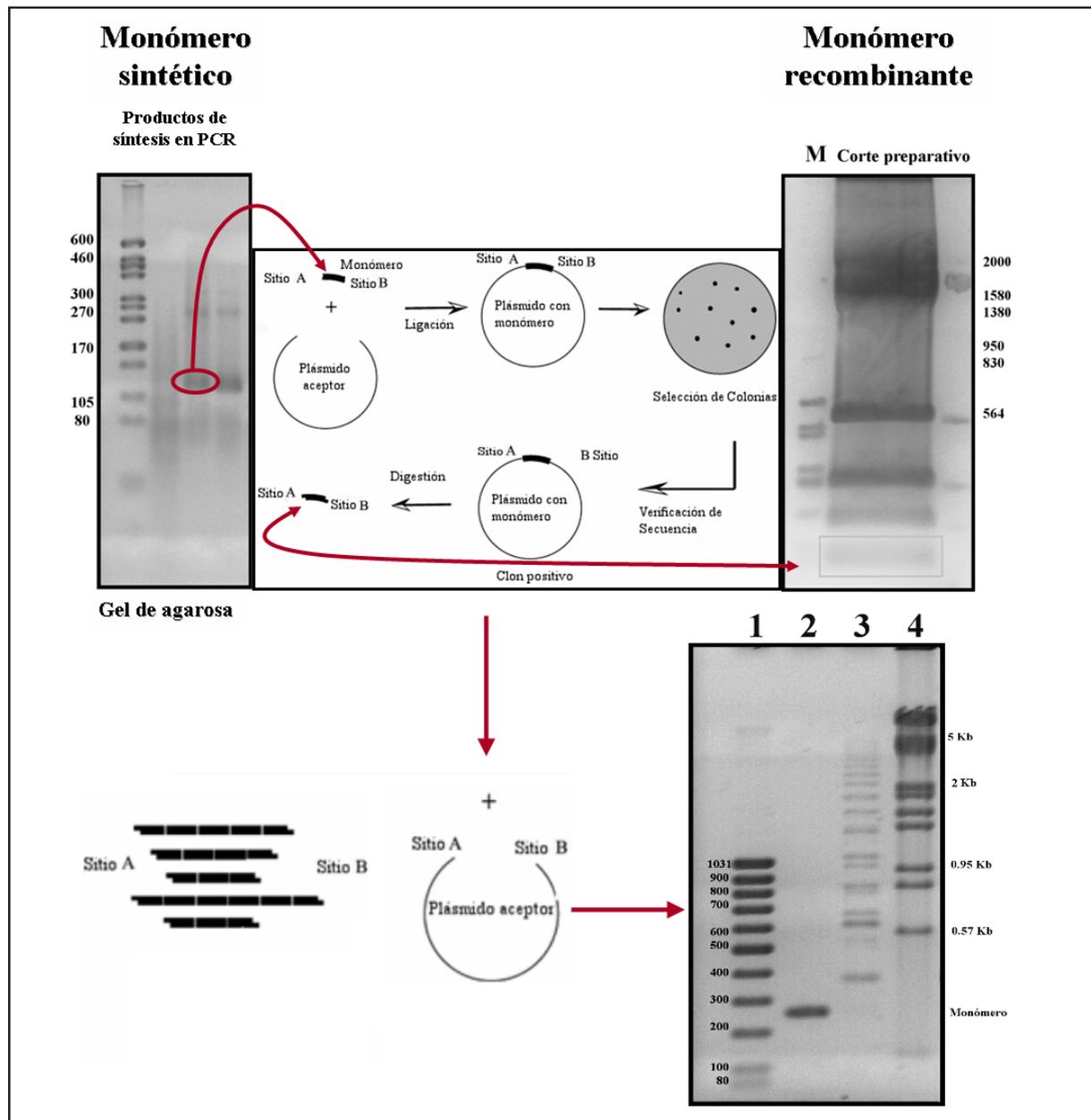


Figura 3. Esquema del proceso de obtención del gen mono y multimérico del biopolímero REDV_n y análisis de los resultados en gel electroforético de agarosa. *Panel superior:* Síntesis por PCR del gen, clonación y obtención del gen monomérico recombinante a gran escala. *Panel inferior:* Concatenación del gen monomérico REDV. Calles 1 y 4: marcadores de DNA; Calle 2: 200 ng de uno de los biopolímeros obtenidos por concatenación del gen monomérico (REDV)₂; Calle 3: 1/10 de la reacción de concatenación. Los números a los lados de las imágenes indican la posición y tamaño (pb) de los marcadores de DNA.

del biopolímero con IPTG 1 mM, a 37°C durante cuatro horas.

La expresión del polímero pudo diferenciarse fácilmente de la expresión de las proteínas constitutivas de las bacterias con electroforesis en geles de acrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). El examen los lisados bacterianos completos (Fig. 4) reveló que la expresión del polímero tiene lugar solo después de la inducción con IPTG y alcanza su máximo a las 3-4 horas tras la inducción manteniéndose constante durante 24 horas.

Una de las principales características de los ELPs es su comportamiento inteligente, como ya se describió en la introducción. Los ELPs son solubles por debajo de su T_t y segregan de la disolución que los contiene por encima de dicha temperatura. Este comportamiento diferencial con la temperatura se explotó para purificar el polímero

del lisado bacteriano, según el método descrito por Urry para la purificación de los ELPs recombinantes [25]. Se incluyó una muestra de polímero purificado en la electroforesis SDS-PAGE que se muestra en la Figura 4, junto a las muestras que permitieron monitorizar el proceso de producción. Tras la purificación, el rendimiento final en polímero fue de 100 mg/mL de cultivo celular.

El análisis del contenido en aminoácidos y la espectrometría de masas por MALDI-TOF confirmaron el carácter monodisperso y la adecuada correspondencia entre el peso molecular teórico del polímero (80695 Da) (calculado con ayuda del programa informático Gene Runner) y el experimental (80686,81 Da). La Figura 5 muestra el espectro de masas de MALDI-TOF del polímero ($n = 10$). Se puede comprobar que el peso molecular experimental entra dentro del

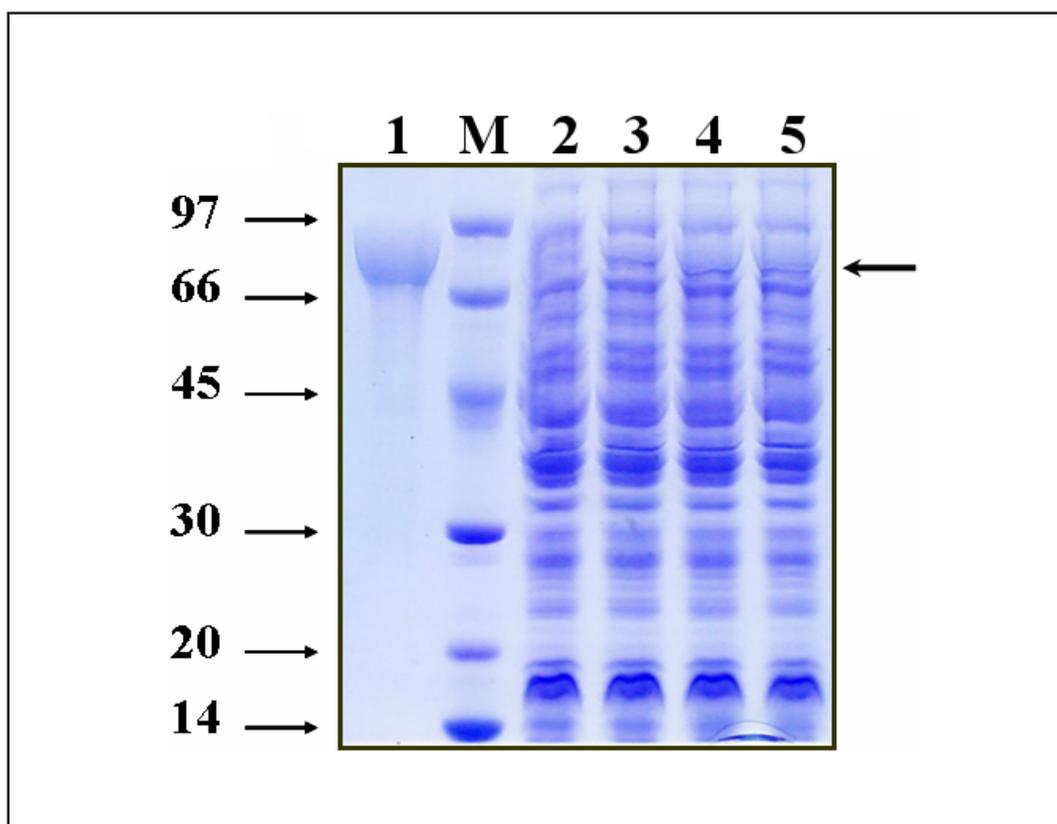


Figura 4. Análisis de la fracción proteica bacteriana total y del polímero REDV₁₀ purificado. Electroforesis SDS-PAGE al 12% del extracto proteico total teñido con Azul de Coomassie. Se analizaron volúmenes estandarizados de medio de cultivo respecto al número de células estimado según la absorbancia a 600nm. La calle M corresponde al marcador de proteínas y los valores en el lateral, al tamaño de las bandas de referencia. Calle 1: se analizan 20 microgramos del biopolímero purificado. Calle 2: corresponde al control negativo el extractos justo antes de añadir el inductor IPTG, mientras que en las calles sucesivas se examinan distintos tiempos de inducción; Calle 3: después de una hora; Calle 4: después de tres horas; y Calle 5: después de veinticuatro horas.

error permitido por esta técnica. La medida del contenido de aminoácidos, se ajustó a la composición teórica (Datos no mostrados).

La Figura 6 muestra el perfil de temperaturas de agregación del polímero a pH = 7,02. Este perfil se basa en medidas turbidimétricas puesto que la solución de polímero permanecía clara por debajo de la T_t , mientras que, por encima de esta, la segregación del polímero en una fase separada dio lugar a un incremento enorme de la turbidez de la muestra. La T_t puede identificarse como la temperatura que produce un 50% de la turbidez máxima. De esta forma, según el perfil de temperatura indicado en dicha figura, la T_t fue de 20,1° C. Esta temperatura está dentro de los límites que normalmente se utilizan durante los pasos de purificación (4° C y 50° C). De acuerdo con la Figura 6, el polímero estaba completamente disuelto a 4° C y completamente precipitado a 50° C.

Esta transición también se pudo caracterizar caloriméricamente. El panel inferior de la Figura 6 muestra un termograma DSC a partir de una

solución de polímero purificado, a una concentración de 50 mg/ml en PBS 0,1 M (pH = 7,02). El termograma muestra la endoterma característica de los ELPs [26]. La temperatura en el valor mínimo del pico endotérmico, se considera la temperatura de transición y, según esta técnica, tuvo un valor similar al que se determinó por turbidimetría. Las pequeñas diferencias entre una y otra técnica podrían atribuirse a las lapsos (demoras) térmicas (*thermal lags*) inherentes al proceso dinámico de medida DSC. El área bajo la curva del pico endotérmico se corresponde con la entalpía de transición, asociada al cambio de estado del polímero, y está relacionada con el número de moléculas de agua involucradas en la estructura de tipo clatrato. En este caso, el valor de la entalpía asociada al cambio de fase fue de $\Delta H_0 = 3,5$ J/g. Los 2 valores calorimétricos, T_t y ΔH_0 , fueron razonables, comparados con otros ELPs, teniendo en cuenta la carga neta del polímero y su polaridad media [26].

Para analizar la capacidad del polímero para formar matrices sólidas, se empleó el Diisocianato

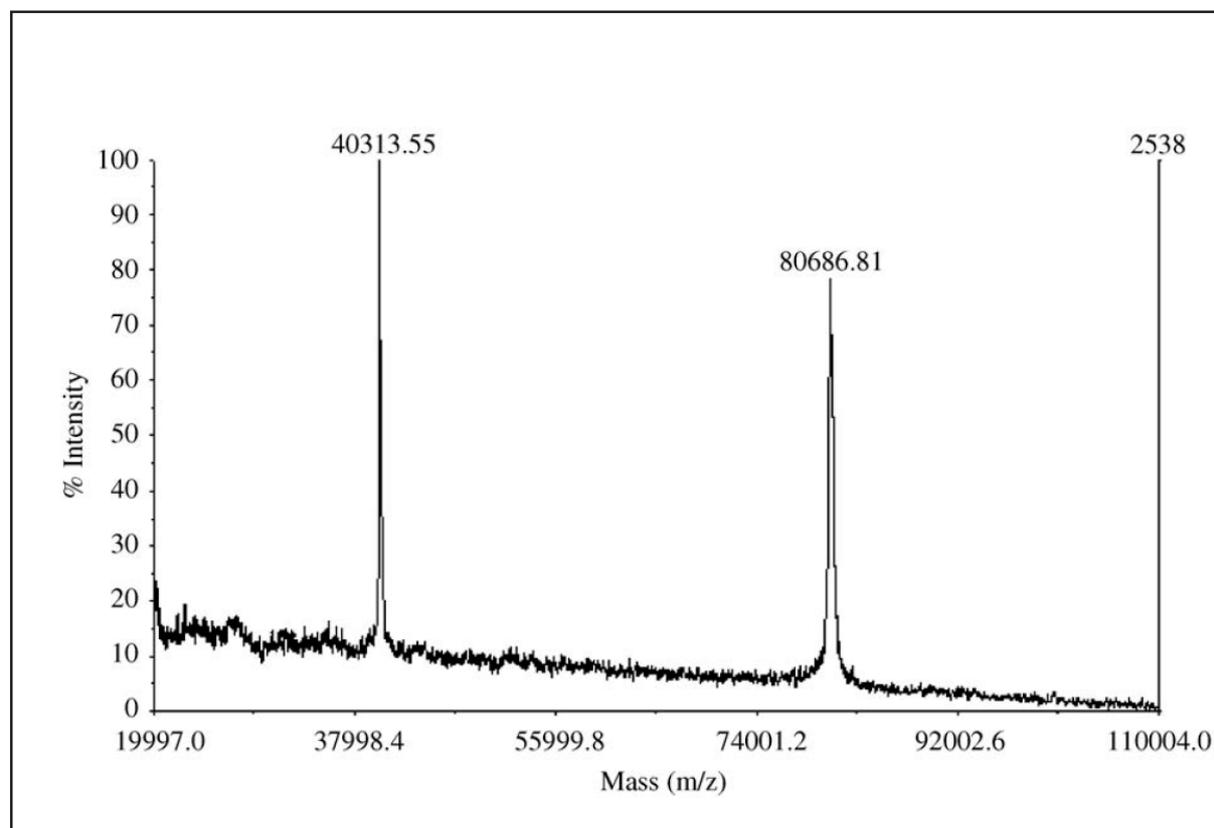


Figura 5. Determinación del peso molecular del polímero REDV₁₀ por espectrometría de masas MALDI-TOF/MS.

de Hexametileno (HDI) como agente entrecruzante. Los residuos γ -amino libres de las lisinas son grupos funcionales muy versátiles, que pueden servir como puntos de entrecruzamiento o como puntos clave para llevar a cabo otro tipo de modificaciones químicas de interés. Los hidrogeles obtenidos, resultaron tener unas buenas propiedades mecánicas, eran insolubles y tenían

una consistencia adecuada para la sutura cualidad, muy apreciada en algunas aplicaciones. Como puede observarse en la Figura 7, el HDI permitió crear matrices de gran transparencia. Estas matrices conservaron las características físicas del biopolímero y experimentaron un cambio de densidad al cambiar la temperatura debido a la transición de fases.

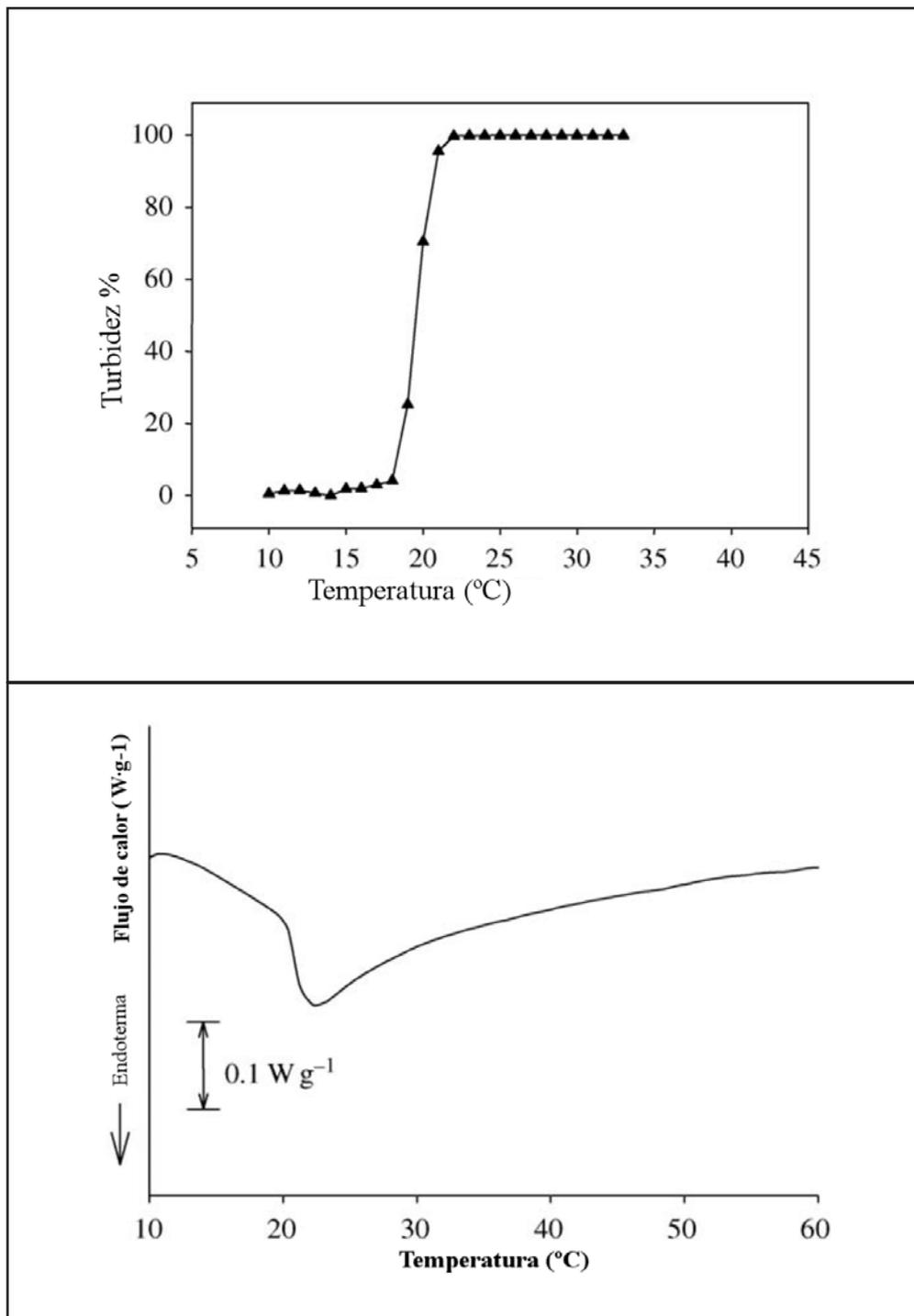


Figura 6. Perfil turbidimétrico y calorimétrico del polímero REDV₁₀.

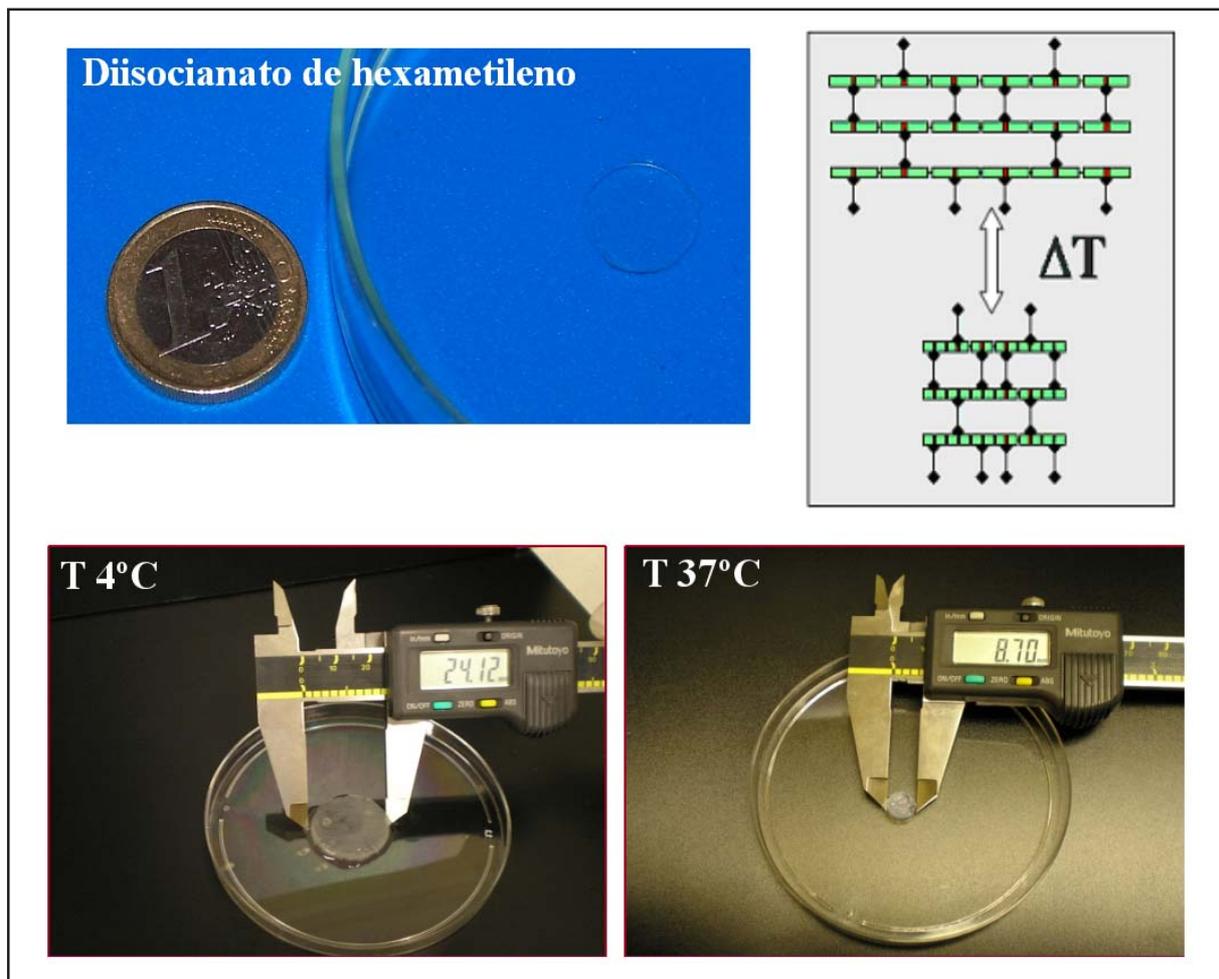


Figura 7. Hidrogel de REDV obtenido por entrecruzamiento del polímero REDV₁₀ con HDI y esquema del polímero entrecruzado a diferentes temperaturas. El hidrogel de REDV₁₀ entrecruzado con HDI conserva el comportamiento inteligente del polímero de partida cuando se somete a temperaturas por encima y debajo de su Tt.

Conclusión

La ingeniería genética es capaz de proporcionar las herramientas necesarias para producir biomateriales que cuentan en su estructura con secuencias peptídicas complejas. El rendimiento en la producción de los mismos suele ser bastante superior al que se alcanza con otros procedimientos convencionales. De esta forma se pueden conseguir sustratos capaces de suplantar con gran precisión, al menos temporalmente, a los componentes naturales que imitan. En este sentido, los polímeros de tipo elastina (ELPs), proporcionan sustratos capaces de reproducir las cualidades mecánicas de la ECM y pueden incorporar secuencias bioactivas que modifiquen sus propiedades funcionales así como sus características físico-químicas.

Agradecimientos

El presente trabajo ha podido ser realizado gracias a la financiación recibida de la Junta de Castilla y León (VA087A06, VA016B08 y VA030A08), del Ministerio de Educación y Ciencia (MAT2007-66275-C02-01 y NAN2004-08538), y la Unión Europea a través del proyecto Marie Curie RTN Biopolysurf (MRTN-CN-2004-005516).

Bibliografía

1. **Langer R, Tirrell DA.** *Designing materials for biology and medicine.* Nature 2004;428:487-492.
2. **Maskarinec SA, Tirrell DA.** *Protein engineering approaches to biomaterials design.* Current Opinion in Biotechnology 2005;16:422-426.

3. **Lutolf MP, Hubbell JA.** *Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering.* Nature Biotechnology 2005; 23:47-55.
4. **Sagnella S., Anderson E., Sanabria N., Marchan R.E., and Kottke-Marchant K.** *Human Endothelial Cell Interaction with Biomimetic Surfactant Polymers Containing Peptide Ligands from the Heparin Binding Domain of Fibronectin.* Tissue Eng. 2005; 11(1-2): 226–236.
5. **Mark D. Sternlicht and Zena Werb.** *How Matrix metalloproteinases regulate cell behavior.* Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2001. 17:463–516.
6. **F.X. Maquart *, G. Bellon, S. Pasco, J.C. Monboisse** *Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation.* Biochimie. 2005; 87:353–360.
7. **J. F. Mano, G.A. Silva, H. S. Azevedo, P. B. Malafaya, R. A. Sousa, S. S. Silva, L. F. Boesel, J.M. Oliveira, T. C. Santos, A. P. Marques, N. M. Neves and R. L. Reis.** *Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends.* J. R. Soc. Interface. 2007; 4, 999–1030.
8. **Rodríguez-Cabello JC, Reguera J, Girotti A, Arias FJ, Alonso M.** *Genetic Engineering of Protein-Based Polymers: The Example of Elastinlike Polymers.* Advances in Polymer Science. 2006; 200:119-167.
9. **Girotti A, Reguera J, Rodríguez-Cabello JC, Arias FJ, Alonso M, Testera AM.** *Design and bioproduction of a recombinant multi(bio)functional elastin-like protein polymer containing cell adhesion sequences for tissue engineering purposes.* Journal of Materials Science-Materials in Medicine. 2004; 15:479-484.
10. **Rodríguez-Cabello JC, Reguera J, Alonso M, Parker TM, McPherson DT, Urry DW.** *Endothermic and exothermic components of an inverse temperature transition for hydrophobic association by TMDSC.* Chemical Physics Letters. 2004; 388:127-131
11. **Rincon AC, Molina-Martinez IT, de Las Heras B, Alonso M, Bailez C, Rodríguez-Cabello JC, et al.** *Biocompatibility of elastin-like polymer poly(VPAVG) microparticles: in vitro and in vivo studies.* Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2006; 78A:343-351
12. **Arias FJ, Reboto V, Martín S, Lopez I, Rodríguez-Cabello JC.** *Tailored recombinant elastin-like polymers for advanced biomedical and nano(bio)technological applications.* Biotechnology Letters. 2006; 28:687-695.
13. **Di Zio K, Tirrell DA.** *Mechanical properties of artificial protein matrices engineered for control of cell and tissue behavior.* Macromolecules. 2003; 36:1553-1558.
14. **Lee J, Macosko CW, Urry DW.** *Phase transition and elasticity of protein-based hydrogels.* Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition. 2001; 12:229-242.
15. **Urry DW, Parker TM, Reid MC, Gowda DC.** *Biocompatibility of the Bioelastic Materials, Poly(GVGVP) and Its Gamma-Irradiation Cross-Linked Matrix - Summary of Generic Biological Test-Results.* Journal of Bioactive and Compatible Polymers. 1991; 6:263-282
16. **PJ, Tirrell DA.** *Physical properties of artificial extracellular matrix protein films prepared by isocyanate crosslinking.* Biomaterials. 2004; 25:1261-1267.
17. **Nicol A GD, Parker TM, Urry DW.** *Cell adhesive properties of bioelastic materials containing cell attachment sequences.* New York: Plenum Press, 1994.
18. **Nowatzki PJ, Tirrell DA.** *Physical properties of artificial extracellular matrix protein films prepared by isocyanate crosslinking.* Biomaterials. 2004; 25:1261-1267.
19. **Panitch A, Yamaoka T, Fournier MJ, Mason TL, Tirrell DA.** *Design and Biosynthesis of Elastin-Like Artificial Extracellular-Matrix Proteins Containing Periodically Spaced Fibronectin CS5 Domains.* Macromolecules. 1999; 32: 1701-1703.
20. **Laurent D., Nicolas F. Alain J P. Bernard H., Laurent D.** *Elastin as a matrikine.* Critical reviews in oncology/hematology. 2004; 49(3):235-44
21. **Senior RM, Griffin GL, Mecham RP, Wrenn DS, Prasad KU, Urry DW.** *Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly, a Repeating Peptide in Elastin, Is Chemotactic for Fibroblasts and Monocytes.* Journal of Cell Biology. 1984; 99:870-874.
22. **Floquet N, Hery-Huynh S, Dauchez M, Derreumaux P, Tamburro AM, Alix AJP.** *Structural characterization of VGVAPG, an elastin-derived peptide.* Biopolymers. 2004;76:266-280.
23. **Lombard C, Arzel L, Bouchu D, Wallach J, Saulnier J.** *Human leukocyte elastase hydrolysis of peptides derived from human elastin exon 24.* Biochimie. 2006;88:1915-1921.
24. **Lombard C, Bouchu D, Wallach J, Saulnier J.** *Proteinase 3 hydrolysis of peptides derived from human elastin exon 24.* Amino Acids. 2005;28:403-408.
25. **D.T. McPherson, J. Xuy, D.W. Urry.** *Protein. Expr. Purif. What sustains life?* 1996; 7:51.
26. **D. W. Urry, Angew.** *Molecular Machines: How Motion and Other Functions of Living Organisms Can Result from Reversible Chemical Changes.* Chem. Int. Ed. Engl. 1993; 32:819.