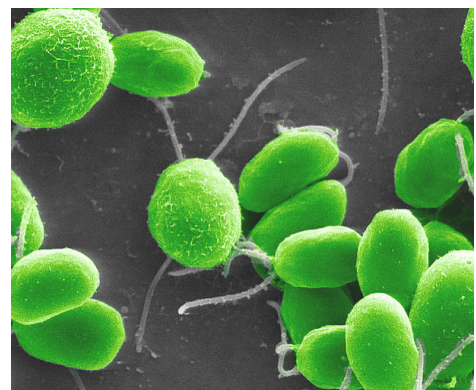




TRABAJO FIN DE MÁSTER

# OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE COMPACTACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIANTE EL USO DE VECTORES CATIONICOS DERIVADOS DE AZÚCARES







TRABAJO FIN DE MÁSTER  
MÁSTER EN ESPECIALIZACIÓN PROFESIONAL EN  
FARMACIA: ESPECIALIDAD ALIMENTACIÓN Y SALUD

# OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE COMPACTACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIANTE EL USO DE VECTORES CATIÓNICOS DERIVADOS DE AZÚCARES

**Alumno:** David Pérez Alfonso

**Tutor/a:** Manuel López López  
María Luisa Moyá Morán

**Departamento:** Química Física (Facultad de Química)

Sevilla, Julio 2019





María Luisa Moyá Morán, Profesor del Departamento de Química Física de la Universidad de Sevilla, y Manuel López López, Profesor del Departamento de Ingeniería Química, Química Física y Ciencias de los Materiales de la Universidad de Huelva,

INFORMAN, que el presente trabajo titulado "OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE COMPACTACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIANTE EL USO DE VECTORES CATIÓNICOS DERIVADOS DE AZÚCARES" ha sido realizado, bajo nuestra tutorización y asesoramiento, dentro del Departamento de Química Física durante el curso académico 2018/19, constituyendo la memoria que presenta el Ldo. David Pérez Alfonso como Trabajo Fin de Máster del Máster en Especialización Profesional en Farmacia, especialidad Alimentación y Salud, y que cumple los requisitos necesarios para ser presentado como Trabajo Fin de Máster.

Y para que conste, a los efectos oportunos, se expide el presente informe en Sevilla, a 3 de julio de 2019.

Fdo.: María Luisa Moyá Morán

Fdo.: Manuel López López

Vº Bº

Fdo.: Jaime Oviedo López  
Director del Departamento



**Resumen:** En este trabajo se ha estudiado la interacción entre el vector polimérico catiónico PUMan y dos moléculas distintas de ácido desoxirribonucleico: ADN de timo de ternera, ADNct, y el ADN plasmídico *Phyco69*. Para ello, se ha llevado a cabo un estudio de carácter multidisciplinar, realizándose ensayos para determinar la toxicidad del polímero usado como vector, así como una gran variedad de técnicas de caracterización fisicoquímica (fluorescencia, potencial Z, dispersión de luz dinámica, dicroísmo circular y microscopía de fuerza atómica). En primer lugar se llevaron a cabo dichos ensayos con el ADNct, que es comercial, para comprobar que el vector polimérico PUMan interaccionaba con los ácidos nucleicos. Posteriormente se estudió la formación del poliplejo PUMan/*Phyco69* para diseñar y ejecutar un protocolo de transformación genética en la microalga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* usando este complejo. La importancia de los ensayos realizados en el presente trabajo radica en la posibilidad de optimizar diversos sistemas químicos utilizados como vectores en el campo de la ingeniería genética.

**Palabras Clave:** Polímero, ADN, poliplejo, transformación genética, *C. reinhardtii*.

**Abstract:** The interactions between the cationic polymer PUMan and two different DNA molecules: calf thymus DNA, ctDNA, and the plasmidic DNA, *Phyco69*, have been studied in this work. In order to do this, a multidisciplinary study has been carried out. The evaluation of the polymer's toxicity as well as a complete physicochemical characterization of the polymer/nucleic acid complexes using fluorescence, Z potential, dynamic light scattering, circular dichroism and atomic force microscopy were done. The work began using the commercial ctDNA in order to obtain information about the interactions between PUMan and nucleic acids. Once the formation of PUMan/ctDNA complexes was demonstrated, the PUMan/*Phyco69* polyplex was studied and, subsequently, a genetic transformation protocol in the unicellular microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* by using this polyplex was run.

The importance of the experiments developed in the present study lies in the possibility of optimizing different chemical systems used as vectors in the field of Genetic Engineering

**Keywords:** Polymer, DNA, polyplex, genetic transformation, *C.reinhardtii*.





# Índice

<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1. Agentes terapéuticos usados en Ingeniería Genética: ácidos nucleicos.....	2
1.1.1. ADN plasmídico (ADNp).....	3
1.2. Vehiculización del material genético: vectores.....	4
1.2.3. Vectores poliméricos.....	5
1.3. Empleo de los complejos vector polimérico - ácido nucleico en las células diana..	6
1.3.1. Transformación genética.....	6
1.3.2. Transfección celular.....	8
1.4. Relevancia del estudio.....	9
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>10</b>
<b>3. Materiales y métodos.....</b>	<b>11</b>
3.1. Disolventes y tampones empleados.....	11
3.2. Preparación de los poliplejos.....	12
3.3. Ácidos nucleicos utilizados.....	12
3.3.1. ADN de timo de ternera (Calf thymus DNA, ADNct).....	12
3.3.2. ADN plasmídico.....	12
3.4. Polímero catiónico.....	13
3.4.1. PUMan.....	13
3.5. Medidas de Fluorescencia en estado estacionario.....	14
3.6. Medidas de potencial zeta.....	15
3.7. Medidas de dicroísmo circular (CD).....	16
3.8. Microscopia de Fuerza Atómica (AFM).....	17
3.9. Electroforesis en gel de agarosa.....	18
3.10. Estudio de fitotoxicidad <i>in vivo</i> .....	18
3.11. Transformación genética de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	19
3.11.1. Agitación mediante perlas de vidrio.....	20
<b>4. Resultados y discusión.....</b>	<b>21</b>
4.1. Estudios de fitotoxicidad de los vectores poliméricos:.....	21
4.2. Caracterización fisicoquímica de la interacción entre PUMan y el ADNct.....	22
4.3. Caracterización fisicoquímica de la interacción entre el vector polimérico PUMan y el plásmido <i>Phyc69</i> .....	26
4.4. Ensayos de Ingeniería genética: Transformación genética de <i>C. reinhardtii</i> .....	31
<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>33</b>
<b>6. Bibliografía.....</b>	<b>34</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>39</b>



## 1. Introducción.

Los genes son los responsables de las propiedades y características de los organismos vivos. Para modificar el genoma de un organismo o modular la expresión de ciertos genes se emplean técnicas de Ingeniería Genética. Mediante dichas técnicas se persigue conseguir una serie de beneficios industriales – optimización de la obtención de un sustrato biotecnológico determinado, ya sea en el proceso de purificación como en el proceso de producción – y/o beneficios en el área clínica – mejora de las estrategias englobadas dentro del marco de la terapia génica (Zaman et al., 2012).

Gracias a las técnicas de manipulación genética disponibles, se han conseguido expresar una gran variedad de sustancias, principalmente de carácter proteico, en diversos microorganismos, como por ejemplo en diferentes microalgas. Entre dichos productos se pueden destacar proteínas con propiedades terapéuticas, como subunidades de vacunas, anticuerpos u hormonas (Scranton et al., 2015).

Una de las aplicaciones en el ámbito clínico de la Ingeniería Genética es la terapia génica, que se puede definir como el conjunto de técnicas enfocadas a modular la expresión de determinadas proteínas alteradas, mediante la introducción en la célula diana de secuencias de ácidos nucleicos (ADN o ARN) unidas a un vector que puede ser de diversa naturaleza, con el fin de revertir o paliar el trastorno biológico que dichas proteínas ocasionan en el individuo (Gwan et al., 2006).

Existen dos componentes esenciales que tienen en común las terapias génicas empleadas en la actualidad:

- i) El material genético, que será el factor que ejercerá la acción terapéutica en las células diana. Deberá tener la capacidad de expresarse adecuadamente en la célula diana para ejercer su función (Vacik et al., 1999).
- ii) El vector, que será el componente que actuará como vehículo del material genético. Deberá formar con el material genético un sistema que sea

eficiente en la transfección, a la vez que biocompatible, evitándose el uso de compuestos que sean citotóxicos (Schaffer and Lauffenburger, 1998).

### **1.1. Agentes terapéuticos usados en Ingeniería Genética: ácidos nucleicos.**

El ADN es el material genético predominante en los seres vivos. No fue hasta los años 60 del siglo XX, cuando Watson y Crick estudiaron al detalle la estructura del mismo (Watson and Crick, 1953). Gracias a sus investigaciones, describieron dos características de la molécula que asentaron las bases de los estudios posteriores realizados:

- La complementariedad de las bases que conforman la secuencia de nucleótidos.
- La naturaleza de la doble hélice del polinucleótido.

El descubrimiento hecho por parte de Watson y Crick permitió demostrar la teoría de Chargaff que postulaba la existencia de una complementariedad de bases en la secuencia – adenina (A) complementaria a timina (T) y guanina (G) complementaria a citosina (C) –(Chargaff et al., 1951) y además, permitió explicar, desde la perspectiva de la Biología Molecular, el descubrimiento realizado en la década anterior por Avery, McCarty y Macleod (McCarty et al., 1944) que afirmaban que el ADN era el *principio transformante* que permitía la transferencia de información genética entre distintas estirpes de bacterias.

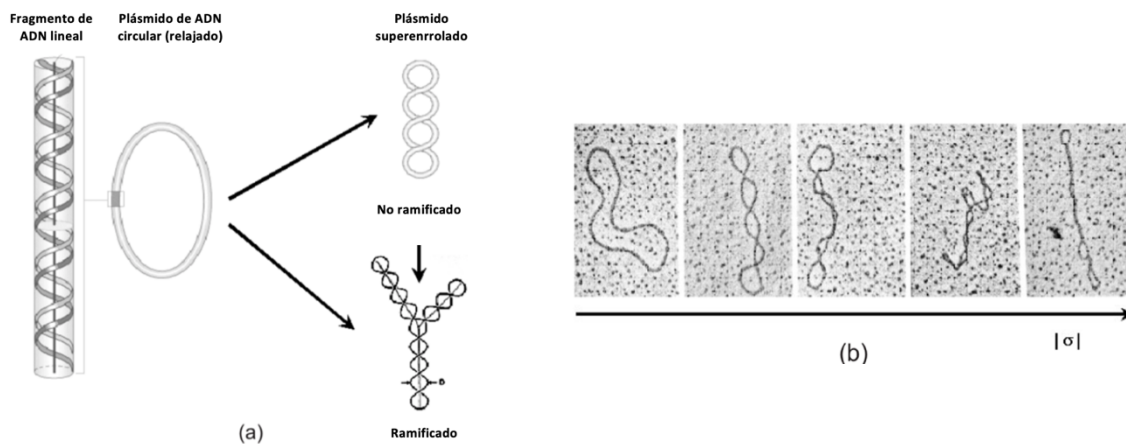
Las características que definen la estructura del ADN implican que la información en la secuencia de bases de ADN podría poseer, debido a la complementariedad de la secuencia de bases, la capacidad de replicación en dos copias idénticas, asentando con este hallazgo las bases para los estudios de manipulación genética realizados en las décadas posteriores.

En la célula eucariota, el material genético se organiza en el interior del núcleo, en una estructura denominada cromatina, que consiste en ADN y proteínas, compactándose de

manera que, además de permitir su almacenamiento en el mismo, permite su interacción con las maquinarias proteicas que regulan los procesos de replicación, reparación y recombinación (Nelson and Cox, 2007).

### 1.1.1. ADN plasmídico (ADNp).

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico, con capacidad de autorreplicación de manera independiente al ADN cromosómico. Se encuentran presentes en bacterias, pero también pueden encontrarse en algunos organismos eucariotas. Según el tipo y las características del plásmido, se podrá encontrar desde una copia hasta cientos de ellas en una misma célula (Karp G et al., 2013). Presentan un tamaño variable, de entre 1-1000 kb (kb: kilopares de bases), así como diferentes estructuras dependiendo del grado de compactación de los mismos. Se podrán encontrar plásmidos con conformación lineal, así como plásmidos circulares (Figura 1).



**Figura 1.** Representación esquemática de la estructura del ADN: a) fragmento lineal, con bucle cerrado y con topologías superenrollada; b) ADN plasmídico superenrollado (Ferreira G, 2005).

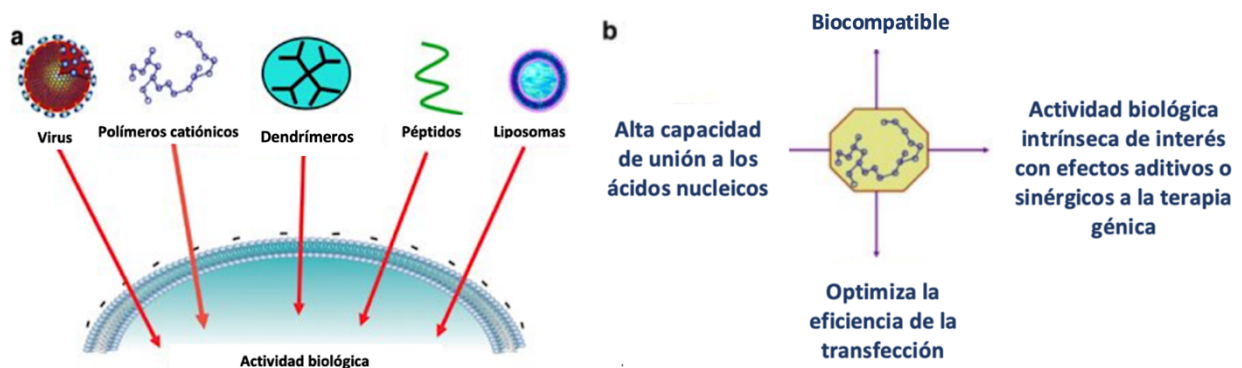
El uso de plásmidos ha sido crucial para potenciar el desarrollo de la biotecnología. Los plásmidos permiten la introducción de ADN exógeno en una célula animal o bacteriana, mejorando u optimizando alguna de sus características biológicas. Su versatilidad posibilita su utilización con fines muy dispares (Walther and Stein, 2015):

- Producción de proteínas recombinantes de aplicación en investigación básica y/o aplicada (hormonas, vacunas, polímeros).
- Obtención de organismos modificados genéticamente con propiedades de interés.
- Medicina: terapia génica.

## 1.2. Vehiculización del material genético: vectores.

Los vectores que pueden ser empleados en terapia génica pueden ser de distinta naturaleza, distinguiendo principalmente entre: (Figura 2.a) (Slivac et al., 2017).

- Vectores víricos.
  - o Vectores retrovirales.
  - o Vectores lentivirales.
  - o Adenovirus.
- Vectores no víricos.
  - o Lípidos, generalmente catiónicos.
  - o Polímeros: catiónicos, aniónicos y/o neutros.
  - o Péptidos, generalmente catiónicos.
  - o Nanomateriales inorgánicos.



**Figura 2.** a) Distintos vectores que pueden ser utilizados para introducir ácidos nucleicos en el interior celular; b) Propiedades óptimas que deben presentar los vectores diseñados sintéticamente para optimizar los ensayos de terapia génica (Akthar, 2006)

La elección de un tipo de vector u otro se hará en función de las características de la célula en la que pretenda utilizarse. Independientemente de la naturaleza del vector, el complejo formado con el material genético deberá tener un diseño que lo proteja de la degradación prematura en sangre y que además permita su entrada al interior de las células diana (Figura 2.b) (Han et al., 2006)

### **1.2.3. Vectores poliméricos.**

Los polímeros son macromoléculas formadas por la unión de subunidades de menor tamaño, denominadas monómeros, mediante enlaces covalentes, tras un proceso de polimerización que puede darse por condensación o por adición.

Los polímeros se pueden encontrar con distinta estructura – lineales o ramificados – y tamaño. Además, pueden presentar entrecruzamientos provocados por enlaces entre átomos de distintas cadenas (Nicholson, 2006)

Atendiendo a su carga neta se podrá establecer la siguiente clasificación (Meka et al., 2017):

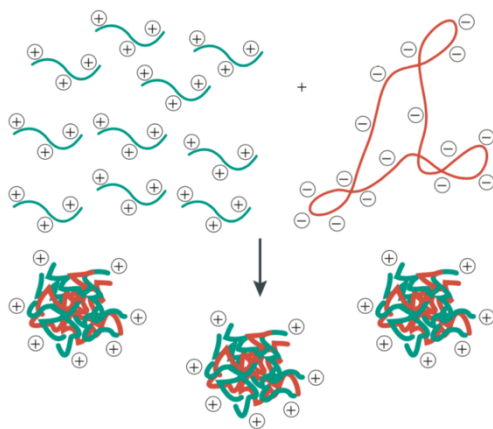
- Catiónicos: con carga neta positiva, como el quitosano.
- Aniónicos: con carga neta negativa, como el ADN.
- Neutros: como por ejemplo el alcohol polivinílico (PVA).

En función de la carga, los polímeros en disolución se dispondrán adquiriendo una conformación u otra. En el caso de los polímeros neutros, las moléculas de polímero se agruparán al azar formando una estructura indefinida. Sin embargo, los polímeros cargados positiva o negativamente, adoptarán una forma extendida como consecuencia de las fuerzas de repulsión que se dan entre las cargas de los mismos (Billmeyer, 2004)

Para conseguir compactar el ADN en estructuras con un diámetro en torno a los 50 - 300 nm, se puede recurrir al uso de polímeros que presenten cationes multivalentes, como la polietilenimina (PEI), alcoholes, polímeros neutros o polímeros aniónicos que contengan sales monovalentes (Meka et al., 2017; Billemer, 2004).

- **Polímeros catiónicos y ácidos nucleicos.**

El interés en utilizar polímeros catiónicos reside en su capacidad de condensar el ADN y en la eficacia que presentan para transportar el ADN a través de la membrana celular (Vijayanathan et al., 2002). Las interacciones entre los polímeros catiónicos y los ácidos nucleicos son fundamentalmente de tipo electrostático, debido a la atracción entre los grupos aniónicos fosfato del esqueleto carbonado del ADN y los grupos cargados positivamente del polímero en cuestión, como por ejemplo, aminas primarias (Tang and Szoka, 1997). La capacidad para formar complejos vector polimérico/ácido nucleico vendrá determinada por la estructura del polímero, su distribución de cargas, la fuerza iónica del medio y pH. En disolución, el polímero catiónico se encuentra en una conformación extendida, pero al interactuar con el ADN se produce la compactación del mismo, formándose un complejo polímero/ADN, de morfología globular, denominado poliplejo. (Figura 3) (Pack et al., 2005).



**Figura 3.** Representación esquemática de la formación de complejos vector polimérico catiónico/ácido nucleico.

### **1.3. Empleo de los complejos vector polimérico - ácido nucleico en las células diana.**

#### **1.3.1. Transformación genética.**

La transformación genética consiste en la alteración genética de una célula mediante la introducción de material genético exógeno. Es por tanto, el proceso mediante el cual se



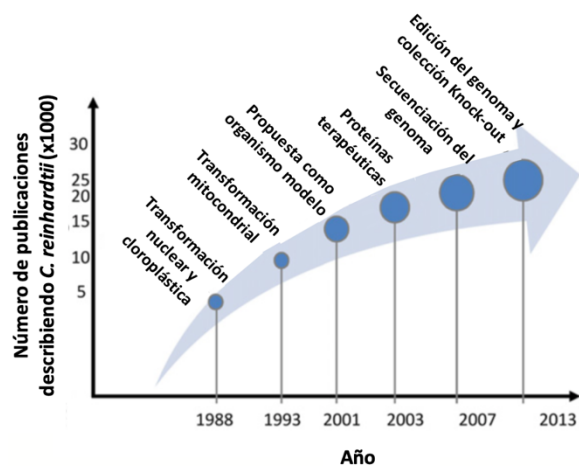
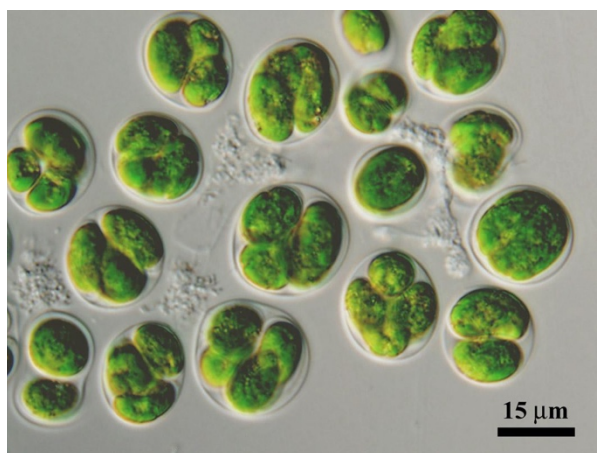
consigue modular la expresión de determinados genes con el fin de obtener u optimizar la obtención de un sustrato.

- **Transformación genética de microalgas: *Chlamydomonas reinhardtii*.**

Las microalgas constituyen un grupo diverso de organismos procariontas y eucariotas, encontrándose entre ellas especies con capacidad de generar productos de interés biotecnológico (Apt and Behrens, 1999; Becker, 2004; Yan et al., 2016) como por ejemplo anticuerpos, inmunotoxinas, agentes antimicrobianos (Yan et al., 2016) o biocombustibles entre otros (Ng et al., 2017).

Las microalgas son diana de ingeniería genética para optimizar su productividad en la obtención de algún sustrato de interés, así como con el fin de mejorar sus límites de tolerancia medioambiental o incrementar la resistencia a pesticidas y/o a patógenos (Khatoon and Pal, 2015).

*Chlamydomonas reinhardtii* es una especie de microalga fotosintética, unicelular y biflagelada, con un tamaño aproximado de 10 micrómetros que ha sido estudiada durante más de 30 años como modelo en investigaciones en el ámbito de la biología molecular (Figura 4) (Scaife et al., 2015).



**Figura 4.** Incremento del uso de *C.reinhardtii* como sistema modelo en biología molecular (Scaife et al., 2015)

Hay un interés creciente en el uso de *Chlamydomonas reinhardtii* con propósitos biotecnológicos debido entre otros factores, a la alta rentabilidad económica de la expresión en dicho organismo de proteínas recombinantes. La caracterización completa de los genomas mitocondriales, cloroplásticos y nucleares de este organismo lo convierte en una plataforma ideal para realizar estudios de transformación genética (Pratheesh et al., 2014).

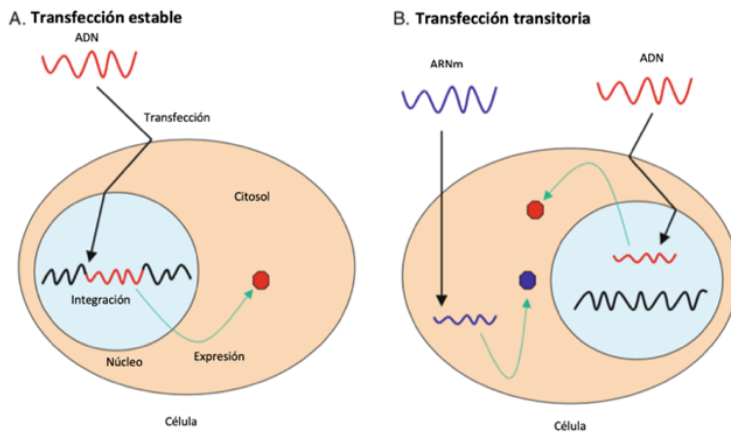
*Chlamydomonas reinhardtii* se caracteriza entre otras cosas por la facilidad para su manipulación en cultivos *in vitro*, ya que presentan una alta tasa de división y una gran adaptabilidad a diversas condiciones ambientales (Merchant et al., 2010) Por las diversas aplicaciones expuestas, se han diseñado en los últimos años diversos protocolos y metodologías de modificación genética en dicho organismo para mejorar el proceso de transformación genética y conseguir una expresión óptima de los genes de interés.

### **1.3.2. Transfección celular.**

La transfección celular es el procedimiento que permite la introducción en una célula animal de material genético exógeno (ya sea ADN o ARN) con el fin de modificarla genéticamente. La transfección celular es una útil herramienta analítica para dilucidar el funcionamiento y regulación de genes de interés, así como para estudiar funciones proteicas (Kim and Eberwine, 2010).

Se distinguirá entre una transfección estable (Figura 5.A) y una transfección transitoria (Figura 5.B):

- Transfección estable: El material genético introducido generalmente contiene una secuencia marcador que servirá como método de selección. El material genético se integrará en el genoma de la célula diana y éste pasará a la célula hija cuando se produzca la replicación (Glover et al., 2005).
- Transfección transitoria: Los genes de interés se expresarán en este caso solo durante un periodo limitado de tiempo y estos no se integrarán en el genoma de la célula huésped (Recillas-Targa, 2006)



**Figura 5.** Diagrama esquemático de los dos modelos de transfección en función de la duración temporal (Kim and Eberwine, 2010).

Se distinguen además una gran variedad de técnicas para llevar a cabo el proceso de transfección, realizando una elección del método en función del sistema y el tipo celular que se esté estudiando con el fin de optimizar la eficiencia de este proceso (Kim and Eberwine, 2010):

- Métodos biológicos: como por ejemplo, transfección mediada por virus (Pfeifer and Verma, 2001)
- Métodos físicos: entre ellos, la microinyección directa, la biobalística, o la electroporación (Mehier-Humbert and Guy, 2005).
- Métodos químicos: son los más extendidos para introducir genes en células de mamíferos. Generalmente, se basan en el uso de polímeros catiónicos, lípidos catiónicos o aminoácidos catiónicos para llevar a cabo el proceso de Transfección (Tymms et al, 2003; Holmen et al., 2014).

#### 1.4. Relevancia del estudio.

Por todo lo expuesto anteriormente, queda patente la importancia de encontrar vectores con capacidad de formar sistemas estables con los ácidos nucleicos, para posteriormente ser aplicados en distintos ámbitos de la biotecnología, ya sea con un fin terapéutico o con un fin industrial.

En el presente trabajo se ha estudiado la interacción del polímero catiónico *PU[(MCis)DTDI]* (*PUMan*) con el ADN de timo de ternera (ADNct) y con el plásmido de ADN circular *Phyco69*, así como su aplicación a la transformación genética de la microalga *C. reinhardtii*.

## 2. Objetivos.

El propósito del proyecto consiste en evaluar si el polímero catiónico PUMan, podría usarse como vector en la formación de poliplejos, con el fin de aplicarlo finalmente a ensayos de ingeniería genética.

Se plantean por tanto los siguientes objetivos:

- a) Realizar la caracterización fisicoquímica de la interacción entre el ADNct y el polímero PUMan. Se inicia el estudio con este sistema porque el ADNct es comercial y mucho más económico que los plásmidos, pero estas investigaciones permitirán comprobar si hay interacción entre el polímero y los ácidos nucleicos. Una vez comprobado que dicha interacción se produce, se pasa a investigar la interacción del polímero con un plásmido cuya expresión en el núcleo celular pueda medirse experimentalmente.
- b) Realizar la caracterización fisicoquímica de la interacción entre el ADN plasmídico *Phyco69* con el polímero PUMan.
- c) Diseñar y ejecutar un protocolo de ingeniería genética con los complejos, lipoplejos, PUMan/ *Phyco69*:
  - Protocolo de transformación genética de la microalga *C. reinhardtii*

### 3. Materiales y métodos.

#### 3.1. Disolventes y tampones empleados.

- **Agua desionizada:** Se empleó para preparar el tampón HEPES. Se obtuvo gracias al sistema Millipore Milli-Q. Presentó una conductividad inferior a  $10^{-6}$  S·m<sup>-1</sup>.
- **HEPES 10 mM, pH 7,4:** Disolución tampón compuesta por ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-etanolsulfónico. Se adquirió en la casa comercial Sigma-Aldrich.
- **Disolución Tris-HCl (1 M):** Disolución tampón compuesta por tris(hidroximetil)aminometano.
- **Disolución TAE 50X:** Disolución usada para la preparación del gel de agarosa.
- 242g de Tris, 57,1 mL de Ácido acético; 100 mL de solución EDTA 0,5 M pH 8,0; 900 mL de H<sub>2</sub>O; pH 8,5.
- **Medio TAP:** Se utilizó para cultivar la microalga *C. reinhardtii* y para realizar los ensayos de fitotoxicidad. Se prepara a partir de las siguientes disoluciones (Stern et al., 2008)
  - **Disolución Tris (1M):** 121 g·L<sup>-1</sup>.
  - **Disolución A (por litro):** 5 g de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 10 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y 40 g de NH<sub>4</sub>Cl.
  - **Disolución B (por litro):** 115 g de K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 6 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
  - **Disolución de Hutner** (Hunter, 1950).
  - Para preparar el medio TAP se dispone de las siguientes cantidades por litro:
    - 10 mL de la disolución A.
    - 1 mL de la disolución B.
    - 20 mL de la disolución de Tris 1M.
    - 1 mL de la disolución de Hutner.
    - 0.95 mL de ácido acético glacial.
    - Agar al 1.5% (para cultivos sólidos).

### 3.2. Preparación de los poliplejos.

En este estudio los poliplejos se prepararon mezclando los polímeros con los ácidos nucleicos, manteniendo invariante en cada ensayo la concentración de ácido nucleico y añadiendo cantidades crecientes de polímero con el objetivo de obtener un buen intervalo de valores de ratio N/P (Ecuación 1). El ratio N/P hace referencia a la relación entre el número de grupos amina del polímero (N; grupos catiónicos) respecto a los fosfatos del ácido nucleico (P, grupos aniónicos) (Cheraghi et al., 2017):

$$\frac{N}{P} = \frac{\frac{\text{Polímero } (\mu\text{g}) \cdot \text{n}^\circ \text{ cargas (+) en la subunidad repetida}}{\text{Subunidad repetida del polímero (Pm)}}}{\frac{\text{ADN } (\mu\text{g}) \cdot \text{n}^\circ \text{ cargas (-)}}{\text{Pm ADN}}} \quad (1)$$

El Peso molecular del ADN es de 618 g/mol por par de bases.

El ADN se considera que tiene carga -2 por cada 618 g (Muñoz-Úbeda et al., 2011).

### 3.3. Ácidos nucleicos utilizados.

#### 3.3.1. ADN de timo de ternera (Calf thymus DNA, *ADNct*).

Para llevar a cabo los ensayos previos de caracterización fisicoquímica de los complejos ADN-polímero catiónico se usó ADN de timo de ternera (*ADNct*), comprado en la casa comercial Sigma-Aldrich.

En todos los ensayos se añadió una cantidad de ADN final tal que la concentración fuese  $1.854 \cdot 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$  ( $3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ).

#### 3.3.2. ADN plasmídico.

Una vez concluidos los ensayos con *ADNct*, se pasó a la realización de los estudios utilizando el plásmido *Phyco69*, de 4846 pb (Anexo I) que presenta como marcadores selectivos para su seguimiento los genes de resistencia a los antibióticos ampicilina y paranomicina.

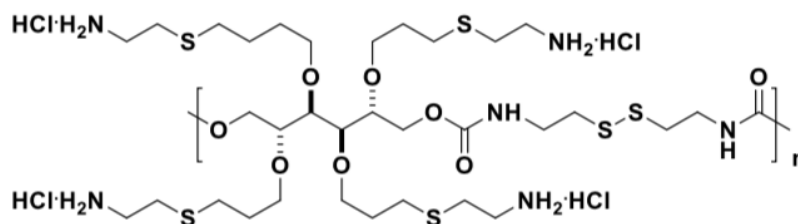
- **Phyco69.**

Este plásmido fue el empleado para llevar a cabo la transformación genética de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. En cada uno de los experimentos de caracterización físicoquímica, la concentración final de Phyco69 fue de  $1.854 \cdot 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ). En los ensayos de transformación genética, se utilizó una concentración final de  $1.4 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $2.265 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ ) del plásmido Phyco69.

### 3.4. Polímero catiónico.

Para formar los distintos poliplejos se utilizó como vector un polímero catiónico derivado del azúcar manitol (Apartado 3.4.1)

- **PU[(MCis)DTDI]: PUMan.**



**Figura 6.** Poliuretano derivado de Manitol (PUMan).

El polímero catiónico fue sintetizado en el laboratorio de la Profesora M<sup>a</sup> de Gracia García Martín, por la Dr. Lucía Romero Azogil y la Dr. Elena María Benito Hernández (Romero-Azogil, 2018), pertenecientes al departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla.

#### 3.4.1. PUMan.

Tiene un peso molecular de  $M_w = 3500 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ , estimado mediante  $^1\text{H-RMN}$ . Presenta una carga neta por cada subunidad monomérica de  $Q=+4$  a pH fisiológico.

### 3.5. Medidas de Fluorescencia en estado estacionario.

La fluorescencia es el proceso mediante el cual una molécula, tras ser excitada con radiación electromagnética, libera parte del exceso de la energía absorbida en forma de fotones para poder relajarse a su estado fundamental (Skoog et al., 2004).

Para estudiar la capacidad de compactación del ADN con el polímero catiónico PUMa se utilizó un compuesto con propiedades fluorescentes: el reactivo Bromuro de 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridinio, también denominado Bromuro de Etidio (EB) (Mishra et al., 2016). Este reactivo se adquirió en Sigma-Aldrich (Riqueza > 95%). La interacción entre los ácidos nucleicos y el Bromuro de Etidio se produce mediante intercalación. Por este motivo, al EB se le atribuye la propiedad de agente intercalante (Lepecq et al., 1967; Zhang et al., 2012). El EB emite fluorescencia cuando es irradiado a una longitud de onda de 480nm, siendo a 589nm la longitud de onda a la cual la emisión de energía alcanza su valor máximo (Ozluer et al., 2014; Zhu et al., 2014).

La capacidad del EB de emitir fluorescencia es mayor cuando se encuentra intercalado entre los pares de bases del ADN que cuando se encuentra en disolución acuosa. Por este motivo, se puede utilizar el EB para obtener información sobre las interacciones entre el ADN y otras moléculas mediante ensayos competitivos. Si al añadir una especie a la disolución ADN+EB se produce una disminución de la emisión de fluorescencia del EB, ello nos indica que está siendo desplazado hacia la disolución al interaccionar el ácido nucleico con la especie añadida (Zhu et al., 2014).

Para realizar las medidas se utilizó un espectrofluorímetro Hitachi F-2500, con una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso de luz. Las medidas se realizaron a una temperatura constante de  $303.0 \pm 0.1\text{K}$  ya que se conectó la celda de medida a un criostato Lauda mediante un flujo de agua. Cada valor representa la media de 3 mediciones. Todas las disoluciones se prepararon utilizando HEPES 10 mM, manteniendo unas concentraciones finales fijas de EB de  $2.43 \cdot 10^{-6}$  M y de ácidos nucleicos (tanto de ADNct

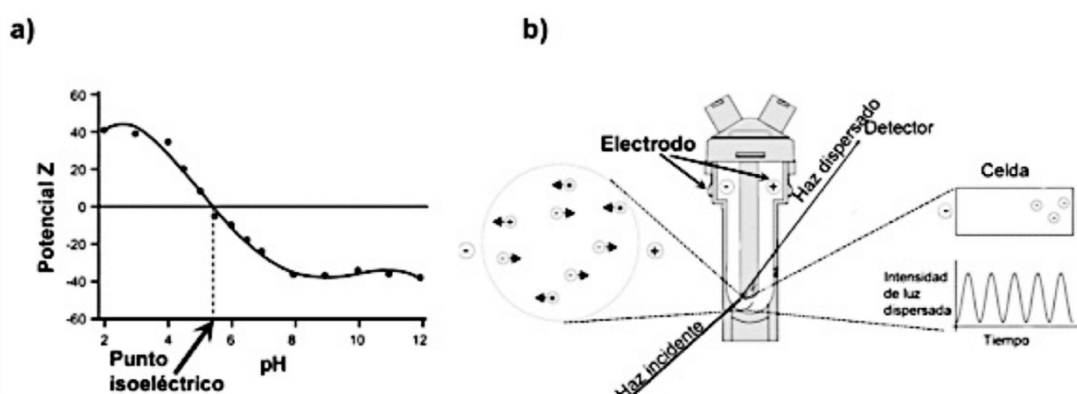


como de ADNp) de  $3 \cdot 10^{-5}$  M. Las concentraciones de los distintos polímeros catiónicos se fueron variando para abarcar un intervalo amplio de ratios N/P.

Las condiciones experimentales para las experiencias fluorimétricas fueron:  $\lambda_{\text{excitación}}$ : 480nm;  $\lambda_{\text{emisión}}$ : 590nm; Rendijas de excitación y emisión: 5nm; Voltaje de la lámpara: 400V.

### 3.6. Medidas de potencial zeta.

El potencial zeta es la diferencia de potencial eléctrico a través de la capa iónica alrededor de un ion coloidal o macromolécula cargada en disolución. Representa la intensidad del campo eléctrico estático existente entre la doble capa formada por el límite de la partícula medida y el medio que la rodea. Las medidas de potencial Z se realizaron con un Zetasizer Nano ZS Malvern Instrument, que emplea un velocímetro Doppler láser (LVD) para medir la movilidad electroforética de la muestra a partir de la velocidad de las partículas. Se utilizó una celda capilar de policarbonato DTS1070. La temperatura se mantuvo constante mediante un sistema Peltier. Este equipo se encuentra en los Servicios Generales de Caracterización Funcional, ubicado en el Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS). (Figura 7) (Zetasizer Nano SeriesManual, 2004).



**Figura 7.** a) Representación gráfica de la variación del valor de Potencial Z en función del pH; b) Representación esquemática de una celda de medida de Potencial Z.

Para obtener los valores de potencial Zeta, se llevó a cabo la preparación de las distintas formulaciones de poliplejos, en HEPES 10mM, a pH 7,4. Se mantuvo constante la concentración de ácidos nucleicos, siendo ésta  $1.854 \cdot 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ), mientras que la concentración de cada uno de los polímeros catiónicos fue variando para estudiar el intervalo de N/P desde 0 hasta 110. Los valores fueron la media de 6 medidas. Todos los experimentos se realizaron a una temperatura constante de  $303.0 \pm 0.1 \text{ K}$ .

### **3.7. Medidas de dicroísmo circular (CD).**

El dicroísmo circular es una técnica espectroscópica característica de moléculas quirales (no superponibles con su imagen especular). Al incidir un haz de luz electromagnética circularmente polarizada sobre dichas moléculas se produce una absorción diferencial a derecha e izquierda. Esta diferencia es el parámetro medible que permite el estudio de moléculas biológicas como los ácidos nucleicos y que por tanto, permite deducir cualquier cambio conformacional que haya podido producirse (Ranjbar et al., 2009). Entre sus aplicaciones se encuentra el estudio de interacciones ADN/ligando (Garbett et al., 2007).

En los ensayos de Dicroísmo se mantuvo una concentración de ADN la relación e igual a  $1.854 \cdot 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  ( $3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ). La concentración de polímero se varió para poder estudiar un intervalo amplio de valores de la relación N/P. Las muestras se prepararon en un volumen final de 1 mL, usando como disolvente HEPES 10 mM, pH 7,4. Se utilizó una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso de luz.

Para llevar a cabo las medidas se empleó un espectropolarímetro Biologic Mos-450, acoplado a criostato Lauda, ajustado a una temperatura invariante de  $303.0 \pm 0.1 \text{ K}$ .

Los espectros de Dicroísmo Circular se realizaron en el intervalo de 220 a 320nm. En este intervalo se encuentran las dos bandas características de los ácidos nucleicos en su conformación B: una negativa, en torno a 247 nm, correspondiente a la supraestructura

helicoidal de la molécula y una positiva, en torno a 278 nm, correspondiente a las interacciones entre las bases debida al apilamiento (Bishop and Chaires, 2003). Los espectros se realizaron 5 veces y se tomó la media de ellos.

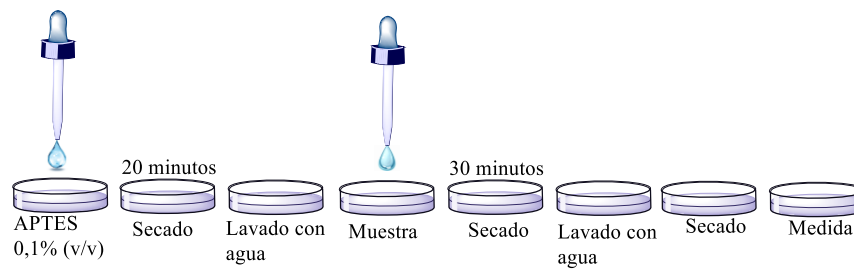
### **3.8. Microscopia de Fuerza Atómica (AFM).**

El microscopio de Fuerza Atómica (AFM) es un instrumento mecano-óptico con una alta sensibilidad, permitiendo obtener imágenes de estructuras con un tamaño del orden de 1 nanómetro (Nanowizard Handbook, 2012). Al analizar una muestra se va registrando la altura sobre la superficie de una sonda acoplada a un listón microscópico pudiendo obtenerse de esta forma un mapa topográfico. Esta técnica permite obtener información relativa a la conformación de los ácidos nucleicos.

Las muestras se prepararon utilizando una concentración constante de ácidos nucleicos igual a  $7.5 \cdot 10^{-7} \text{M}$  y cantidades variables de PUMan. Las medidas se han realizado en los Servicios Generales de Investigación de la Universidad de Sevilla (CITIUS) utilizando el modelo Pico Plus 2500 AFM, del fabricante Molecular Imaging. Los soportes o cantiléver usados fueron de silicio (modelo Pontprobe, Nanoworld) modificados, con una frecuencia de resonancia de 240 KHz y una constante de fuerza nominal de 42 N/m. Las imágenes se tomaron en aire (modo *tapping*). La fuerza entre la superficie de la muestra y la punta ocasiona la flexión del cantiléver, siendo medido por un detector que proporciona un mapa topográfico de  $256 \times 256$  píxeles.

La preparación de las muestras se describe a continuación (Figura 8):

- Modificación de la superficie de mica mediante la adición de APTES 0.1% (v/v).
- Después de 20 minutos, se lava con agua destilada y se deja secar al aire.
- Se añaden 30  $\mu\text{L}$  de muestra sobre la superficie de mica modificada.
- Se dejan reposar 30 minutos.
- Se lava con agua pura y se deja secar al aire libre.



**Figura 8.** Proceso detallado de la preparación de muestras para la visualización mediante AFM.

### 3.9. Electroforesis en gel de agarosa.

Para confirmar la formación de poliplejos en la disolución se realizó una electroforesis en gel de agarosa de los complejos PUMan/*Phyco69* abarcando un intervalo de valores N/P de 0 a 21,4, pudiendo así observar cómo varía la movilidad electroforética del ADN plasmídico en dicho intervalo.

Los geles de agarosa se prepararon al 1% en tampón TAE. Se prepara una disolución de tampón TAE 1x a partir de una disolución stock TAE 50X. Para conseguir disolver la agarosa se calienta hasta llevarla a ebullición.

Al enfriarse la agarosa, se le añade Bromuro de Etidio al 0,1% que se intercalará en el ADN y permitirá su visualización al emitir fluorescencia cuando es irradiado con luz ultravioleta.

### 3.10. Estudio de fitotoxicidad *in vivo*.

Antes de proceder a modificar genéticamente la microalga, se deberá analizar la posible toxicidad que presenta el polímero catiónico elegido para realizar el ensayo de

transformación genética en *Chlamydomonas reinhardtii* (Apartado 3.11). Se ha optado por utilizar el polímero PUMan para realizar dicho ensayo.

Se procede de la siguiente forma:

- En primer lugar, se prepara un cultivo en medio TAP partiendo de un cultivo sólido. Para ello, el cultivo sólido se concentra 100 veces, se centrifuga durante 5 minutos a máxima velocidad y finalmente se resuspende en 1 mL de medio TAP.
- A continuación, para la preparación de la placa, se añade agar al 0.5% p/v a 100 mL de medio TAP.
- Se añaden concentraciones crecientes de disoluciones de PUMan, partiendo de una disolución madre de concentración  $2.05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .
- Se espera a que la placa gelidifique y finalmente, se procede a tomar  $1 \mu\text{L}$  de la disolución de la microalga para realizar la siembra.

Para llevar a cabo este protocolo se ha trabajado en condiciones de esterilidad, bajo campana de flujo laminar, utilizando todo el material de trabajo estéril.

### **3.11. Transformación genética de *Chlamydomonas reinhardtii*.**

La transformación genética de la microalga se lleva a cabo en presencia del polímero catiónico PUMan. Además, el ensayo se ha realizado utilizando el plásmido Phyco69 sin digerir, así como digerido con la enzima de restricción *EcoRI* (adquirida en la casa comercial Thermofisher Scientific). Las concentraciones de PUMan usadas se eligen en función de los resultados previamente obtenidos en los estudios de caracterización fisicoquímica, así como respetando el valor margen de fitotoxicidad que resultó del ensayo descrito en el Apartado 3.9. A partir de dichos resultados, se optó por realizar la experiencia manteniendo un ratio N/P de 21.

Se han llevado a cabo 6 reacciones de transformación genética. En todas ellas, se ha partido de un cultivo con una densidad óptica inicial de 1.259:

1.  $600 \mu\text{L}$  de cultivo +  $1 \mu\text{g}$  de ADNp +  $100 \mu\text{L}$  de PEG

2. 600  $\mu$ L de cultivo + 1  $\mu$ g de ADNp + PUMan
3. 600  $\mu$ L de cultivo + 1  $\mu$ g de ADNp + PUMan + 100  $\mu$ L de PEG
4. 600  $\mu$ L de cultivo + 1  $\mu$ g de ADNp
5. 600  $\mu$ L de cultivo + 1  $\mu$ g de ADNp
6. 600  $\mu$ L de cultivo + 100  $\mu$ L de PEG

El protocolo de transformación se describe en el Apartado 3.11.1.

### **3.11.1. Agitación mediante perlas de vidrio.**

Se ha procedido de la siguiente forma:

- Se concentra 100 veces un cultivo de 600 mL de *C. reinhardtii*, centrifugando 5 minutos a máxima velocidad y resuspendiendo el sobrenadante en medio TAP.
- Se preparan los tubos de reacción como se ha descrito en el Apartado 3.10. A cada tubo de reacción se añade en torno a 1 gramo de perlas de vidrio (0.40-0.60 mm de diámetro).
- Se agita cada tubo de reacción en el vórtex, se añade medio TAP estéril y se vuelve a centrifugar 2 minutos a 3000 r.p.m.
- Se elimina el sobrenadante y se resuspenden las células en medio TAP estéril, se pasan a tubos estériles y se añade medio TAP estéril hasta llegar a un volumen final de 50 mL.
- Se mantienen los tubos de cultivo en una cámara con luz ( $100 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) durante 24h.
- Transcurrido ese tiempo, se centrifugan los tubos a 13.000 r.p.m durante 2-3 minutos y se resuspende el precipitado en 1 mL de medio TAP estéril.
- A continuación se vierte en placas de medio TAP con paranomicina ( $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) al 1% de agar.
- Las placas se mantienen en la cámara de cultivo a 25 °C y con luz ( $100 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).
- A los 5-6 días se podrá comenzar a observar los primeros transformantes.

Este protocolo de transformación se ha llevado a cabo en condiciones de esterilidad, bajo campana de flujo laminar, utilizando todo el material de trabajo estéril.

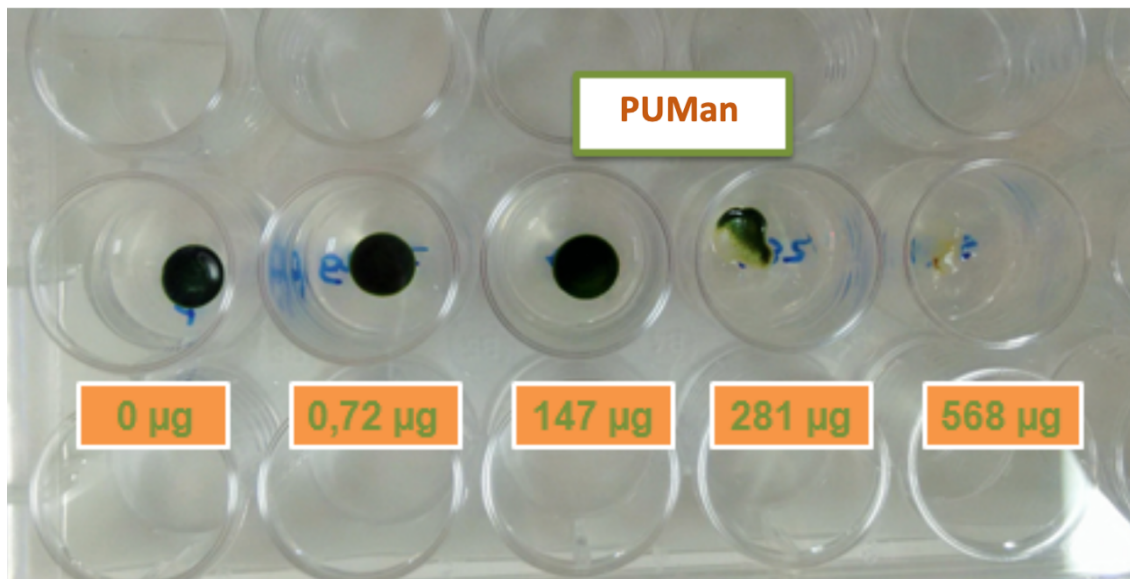
## 4. Resultados y discusión.

En este trabajo se ha estudiado la caracterización fisicoquímica de los complejos PUMan/ADNct y PUMan/*Phyco69*, así como su posterior aplicación en la modificación genética de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*.

### 4.1. Estudios de fitotoxicidad de los vectores poliméricos:

Antes de proceder a realizar los estudios de caracterización fisicoquímica del poliplego formado por los ácidos nucleicos y el vector polimérico PUMan, se llevó a cabo una serie de ensayos para determinar la fitotoxicidad del mismo y, en el caso de no ser fitotóxico, determinar en qué rangos de concentración se podría emplear sin comprometer la viabilidad de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. Para ello, se llevó a cabo el siguiente experimento:

#### ▪ Fitotoxicidad de PUMan.



**Figura 9.** Ensayo de fitotoxicidad de *Chlamydomonas reinhardtii* en presencia del polímero catiónico PUMan tras un tiempo de exposición de 1 semana.

Se realizó un seguimiento de la viabilidad celular a las 24h, 48h y 72h, en presencia de diversas cantidades del polímero catiónico PUMan, que se usará como vector catiónico.

Como se observa en la Figura 9, el polímero catiónico PUMan es fitotóxico a altas concentraciones pero presenta inocuidad a menores valores, sin llegar a comprometer la supervivencia del microorganismo. Así pues, teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se trabajará en un rango de concentraciones de PUMan no nocivo para el microorganismo para así optimizar así el proceso de transformación de *C.reinhardtii*.

#### **4.2. Caracterización fisicoquímica de la interacción entre PUMan y el ADNct.**

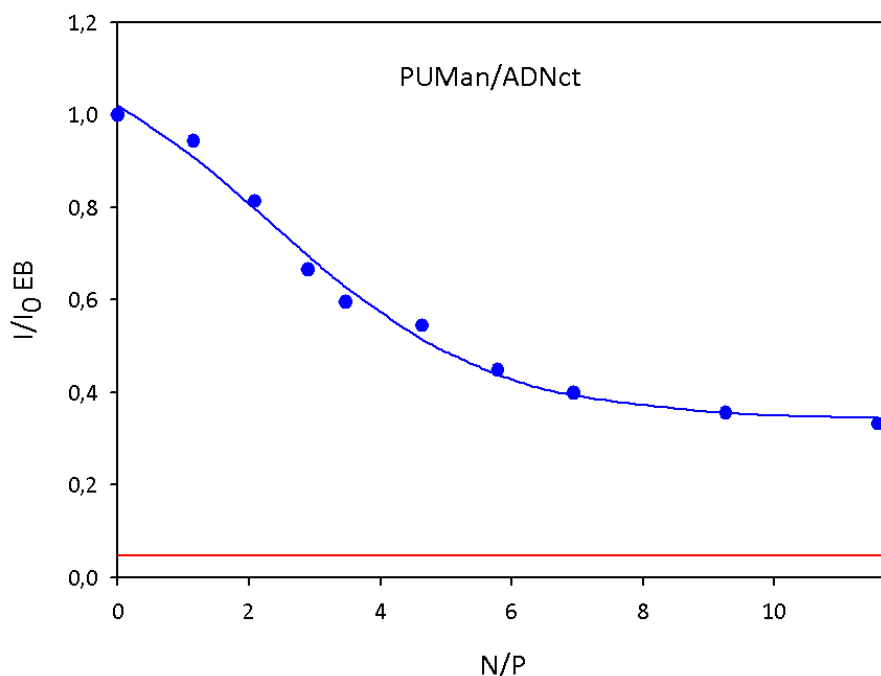
La interacción entre el ADN y los polímeros catiónicos se produce mediante el enrollamiento de estos últimos sobre la superficie de la doble hélice, tras la neutralización de las cargas por la interacción de los grupos fosfato del polinucleótido con la cargas positivas del polímero catiónico (Dinçer et al., 2005). Este enrollamiento produce la formación de complejos que condensan a la molécula de ADN en forma toroidal [20]. Los complejos formados reciben el nombre de poliplejos.

El estudio fisicoquímico de las interacciones ADN/PUMAN se comenzó usando como ácido nucleico el ADNct. ara ello se realizó una serie de ensayos, añadiendo concentraciones crecientes de PUMan y manteniendo constante la concentración de ADNct. En primer lugar, como se expone a continuación, se llevó a cabo el seguimiento de la intensidad de emisión de fluorescencia de la sonda EB. Esta sonda fluorescente consigue intercalarse entre los pares de bases del polinucleótido mediante interacción no covalente, dada la estructura aromática y plana que posee.

Cuando el EB se encuentra entre las bases del ADN, estará inmerso en un ambiente hidrofóbico y presenta una intensidad de fluorescencia mayor que cuando se encuentra



en el seno de la disolución. La interacción con el ADN atenúa los modos de desactivación no radiativa (Cosa et al., 2004).



**Figura 10.** Variación de  $I/I_0$  a una  $\lambda_{589}$  de la sonda fluorescente EB, respecto a la relación  $N/P$  (PUMan/ADNct), en tampón HEPES 10 mM, pH 7,4.  $[ADNct]=3 \cdot 10^{-5}$  M;  $[EB]_f=2,43 \cdot 10^{-6}$  M;  $T=298$ K.

Como se observa en la Figura 10, a medida que se produce un aumento en la relación  $N/P$  (se incrementa el contenido del polímero catiónico en la disolución), la intensidad de emisión de fluorescencia experimenta un decaimiento, aproximándose progresivamente al valor de la intensidad de fluorescencia que presenta el EB en disolución acuosa (en ausencia de ADNct; línea continua en color rojo).

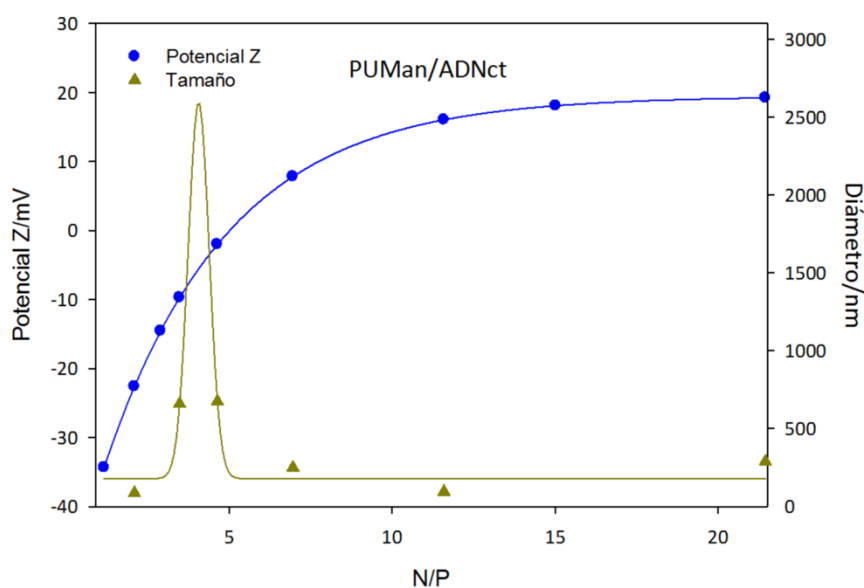
Los datos obtenidos en este experimento indican que, en ausencia de polímero, el EB se encuentra interaccionando con el ADNct ya que al encontrarse inmerso en un medio apolar presenta una mayor capacidad de emitir fluorescencia tras ser irradiado a una longitud de onda de 480 nm.

A medida que se va añadiendo mayor cantidad de polímero catiónico PUMan (aumento del rango de  $N/P$ ), el polímero interacciona mediante fuerzas electrostáticas con el

ADNct y esto provoca un desplazamiento progresivo del EB desde el ADNct a la disolución. Esto explicaría la disminución de la intensidad de fluorescencia observada en la Figura 10.

Sin embargo, parece ser que no todo el EB es desplazado del material genético al seno de la disolución, ya que a pesar de que parece producirse la interacción entre PUMan/ADNct, el valor de  $I/I_0$  obtenido a relaciones N/P altas no llega a equipararse al valor de la intensidad de emisión que presenta la sonda fluorescente en disolución acuosa.

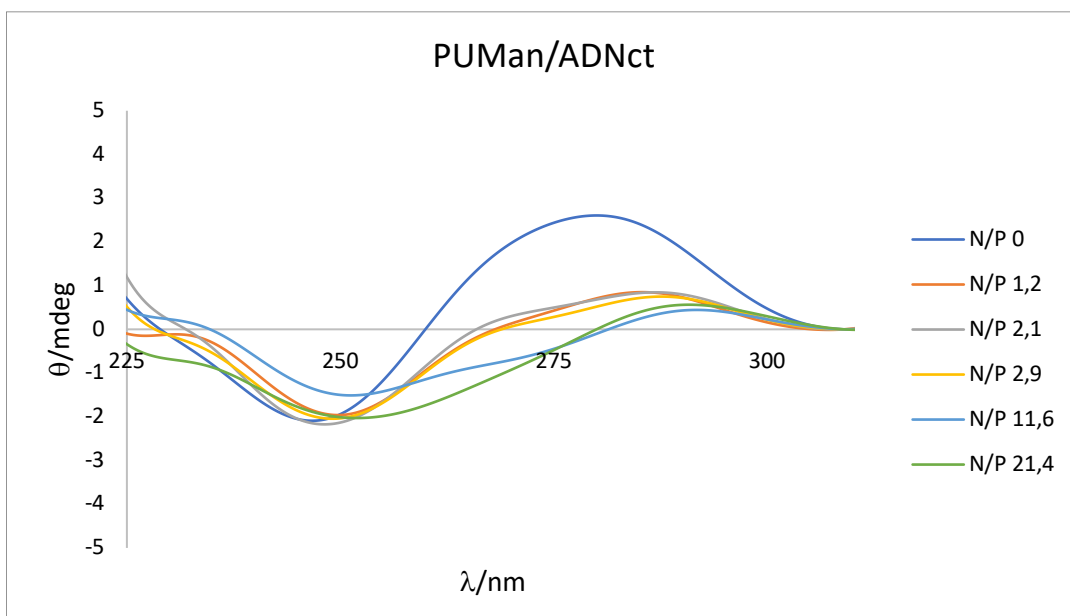
A continuación se procedió a investigar en mayor profundidad la naturaleza del poliplexo formado. Para ello, se realizó un estudio de la variación del potencial Z y del tamaño del poliplexo formado con la relación N/P. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 11.



**Figura 11.** Potencial Zeta y tamaño de partícula del complejo PUMan/ADNct a diferentes relaciones N/P (PUMan/ADNct), en tampón HEPES 10 mM, pH 7,4.  $[ADNct]=3 \cdot 10^{-5}$  M;  $T=298K$ .

El punto de electroneutralidad a partir del cual el poliplexo presenta una carga neta positiva, se alcanza a unos valores de N/P de en torno a 6.

En cuanto al tamaño del complejo PUMan/ADNct formado, el incremento de la concentración de PUMan origina un aumento del tamaño del poliplexo como consecuencia de la disminución de las repulsiones electrostáticas, lo que permite que dichos complejos formen agregados dispersos.

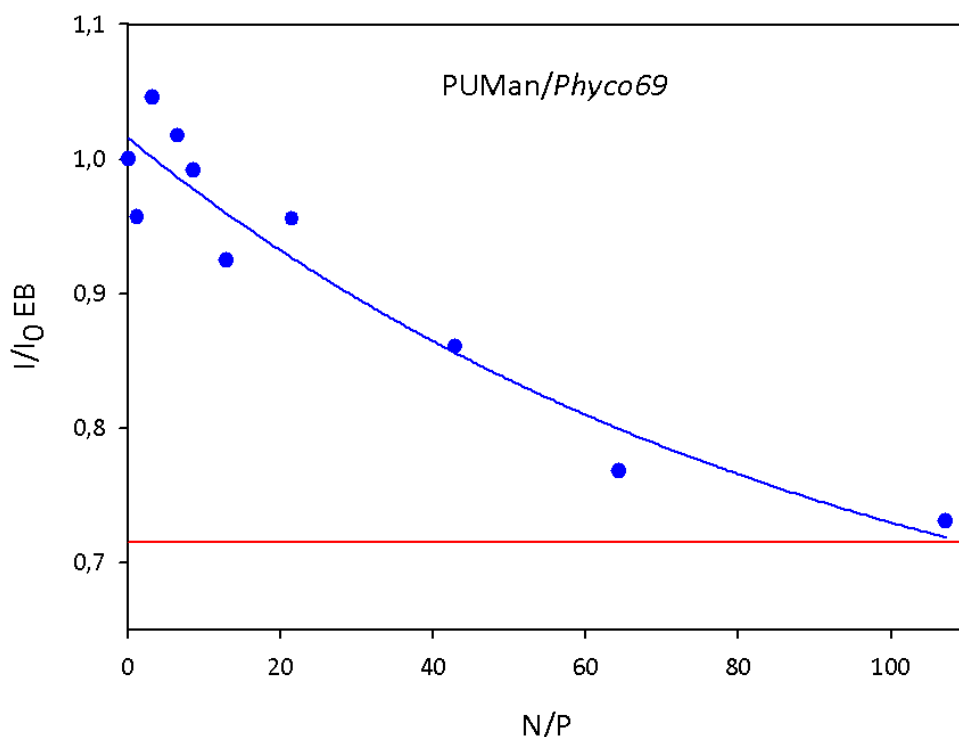


**Figura 12.** Espectro de dicroísmo circular del ADNct a distintos rangos de N/P (PUMan/ADNct), en disolución acuosa de HEPES 10 mM, pH 7,4. [ADNct]= $3 \cdot 10^{-5}$  M; T=298K.

Para complementar los datos anteriores, se obtuvo el espectro de dicroísmo circular del ADNct y se comparó con los espectros del poliplexo PUMan/ADNct a distintos, valores de N/P. Los espectros aparecen en la Figura 12. En el caso de ADNct puro (N/P:0), se pueden observar las dos bandas características del ADN de doble hebra en su forma B (negativa, a una longitud de onda de 247 nm y positiva, a una longitud de onda de 278 nm). A medida que aumenta la relación N/P, la intensidad de la banda positiva (correspondiente a las interacciones debidas al apilamiento de bases) disminuye, y a valores elevados de N/P prácticamente desaparece. Esto nos indica que se está produciendo una interacción entre el polímero PUMan y el ADNct que está originando un cambio conformacional en el mismo.

### 4.3. Caracterización fisicoquímica de la interacción entre el vector polimérico PUMan y el plásmido *Phyco69*.

Una vez finalizados los ensayos entre el vector catiónico PUMan y el ADNct, se pasó a realizar el estudio del poliplexo formado por PUMan y el plásmido *Phyco69*.

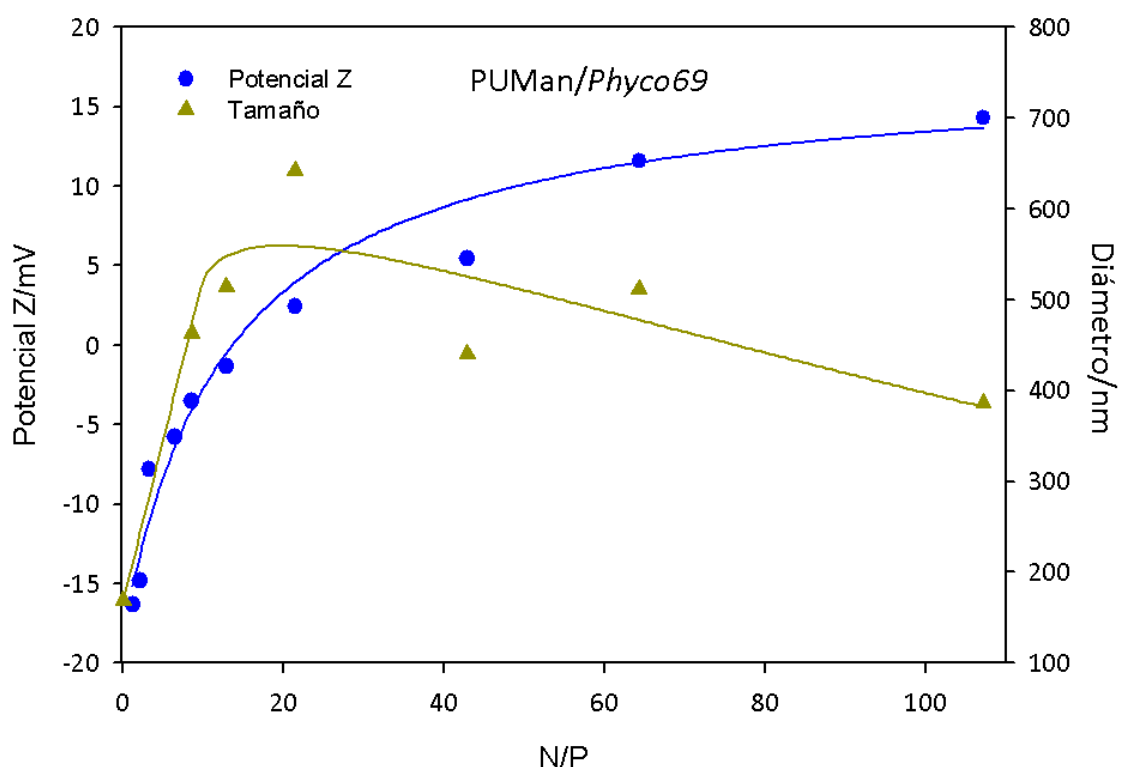


**Figura 13.** Variación de  $I/I_0$  a una  $\lambda_{589}$  de la sonda fluorescente EB, respecto a la relación N/P (PUMan/*Phyco69*), en tampón HEPES 10 mM, pH 7,4.  $[ADNct]=3\cdot 10^{-5}$  M;  $[EB]=2.43\cdot 10^{-7}$  M;  $T=298K$ .

Para ello se comenzó estudiando los cambios en la intensidad de emisión de fluorescencia del EB en una disolución en presencia de plásmido, cuando se añadía el polímero, para distintos valores de N/P. Al igual que en el caso de PUMan/ADNct (Figura 13), se produce un decaimiento de la emisión de fluorescencia con el aumento de N/P. Sin embargo, en este caso el valor de la intensidad de emisión de fluorescencia llega a alcanzar el valor que presenta cuando el EB se encuentra en la disolución. Es decir, a altos valores de N/P todo el EB presente ha sido totalmente desplazado desde su lugar de intercalación entre los pares de bases del nucleótido hacia la disolución. Esto

podría deberse a que la interacción del polímero catiónico PUMan con el ADN plasmídico produce cambios conformacionales de la estructura del ADN-B mayores a los producidos en el ADNct.

Para seguir avanzando en el estudio de la interacción entre el PUMan y el *Phyco69*, se realizaron medidas de potencial Zeta y de tamaño de partícula de PUMan/*Phyco69*, a diferentes valores de N/P.



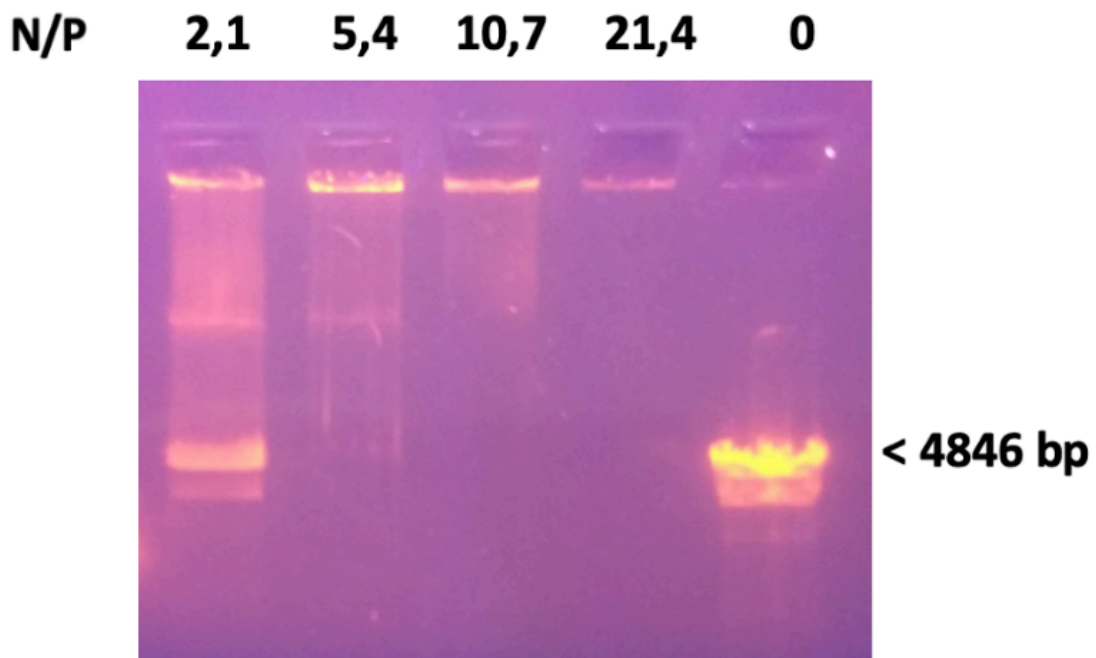
**Figura 14.** Potencial Z y tamaño de partícula del complejo PUMan/*Phyco69* a diferentes relaciones N/P (PUMan/*Phyco69*), en tampón HEPES 10 mM, pH 7,4. [ADNct]= $3 \cdot 10^{-5}$  M; T=298K.

Como se puede ver en la Figura 14, se observa que el potencial Zeta sigue una tendencia sigmoideal, produciéndose la electroneutralidad para un valor de N/P de en torno a 15 y dándose la inversión total de carga para valores altos de N/P. Es un comportamiento semejante al encontrado para los poliplejos PUMan/ADNct.

En cuanto al tamaño, para un valor de N/P=0 (*Phyco69* en ausencia de PUMan) se observa un tamaño pequeño, lo que concuerda con la naturaleza del material genético

estudiado en este ensayo, ya que el plásmido *Phyco69* presenta un tamaño mucho menor que el ADNct. Conforme la relación N/P se va a aproximando al punto en el que el potencial Z es cero, el tamaño va aumentando. Un aumento posterior de N/P resulta en una disminución del tamaño del poliplejo. Estas últimas observaciones pueden explicarse si se tiene en cuenta que cuando los poliplejos tienen carga cero se pueden producir procesos de agregación entre los mismos. Una vez la carga pasa a ser positiva y aumenta, las repulsiones electrostáticas evitan la formación de estos agregados.

Otra técnica que proporciona información acerca de las interacciones entre polinucleótidos y diferentes especies es la electroforesis. La Figura 15 muestra los resultados obtenidos cuando se realizaron experimentos en gel de agarosa para diferentes valores de N/P.

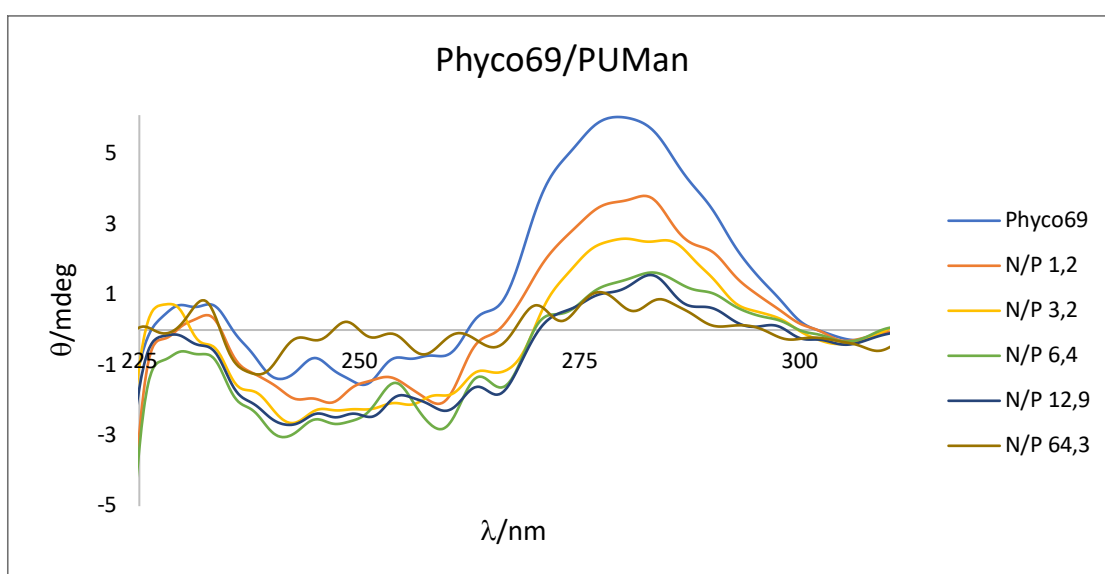


**Figura 15.** Electroforesis en gel de agarosa de *Phyco69* digerida con la enzima EcoRI para distintas relaciones N/P.

Se observa que el plásmido *Phyco69* en ausencia de PUMan presenta una banda característica a 4846 pb, que se ha desplazado hacía el polo positivo, como es de esperar si se considera la carga negativa del plásmido. A medida que aumenta N/P, este desplazamiento es cada vez menor, hasta que permanece sin moverse para valores de

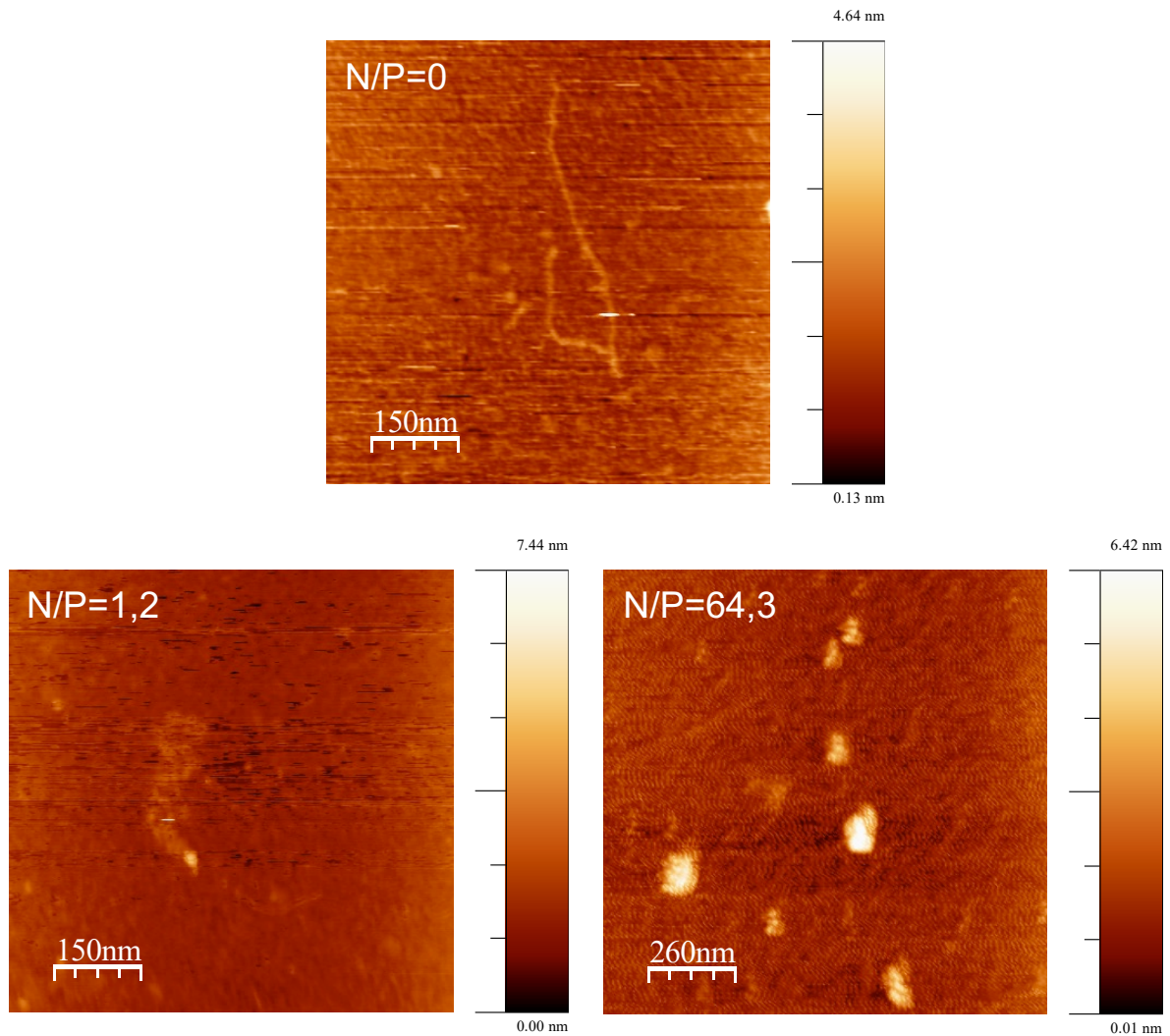
$N/P \geq 10,7$ . Esto se debe a que las moléculas positivamente cargadas de polímero se asocian al plásmido de carácter aniónico, disminuyendo su carga negativa y llegando a producir una inversión de carga, como han mostrado los datos de potencial Z. Una vez el poliplejo adquiere una carga positiva, no se desplaza hacia el polo positivo.

Con el fin de investigar los posibles cambios conformacionales causados en el plásmido de doble hebra *Phyco69* cuando interacciona con el polímero, se registraron los espectros de dicroísmo circular para distintos valores de N/P (ver la Figura 16).



**Figura 16.** Espectro de dicroísmo circular del ADNct a distintos rangos de N/P (PUMan/*Phyco69*), en disolución acuosa de HEPES 10 mM, pH 7,4. [ADNct]= $3 \cdot 10^{-5}$  M; T=298K.

En la Figura 16 se observa una disminución progresiva de la intensidad de la banda positiva, correspondiente al apilamiento de bases, a medida que aumenta el valor de N/P. Además, se produce la desaparición de la banda negativa, asociada a la supraestructura de la molécula, para valores elevados de N/P. Esto parece indicar un cambio conformacional del plásmido, que podría producirse debido a la compactación del mismo al formarse el poliplejo PUMan/*Phyco69*. Para comprobar si esta hipótesis es acertada, se realizaron medidas de microscopía de fuerza atómica, AFM, que permiten la visualización de los poliplejos a diferentes valores de N/P. Las imágenes obtenidas utilizando AFM aparecen en la Figura 17.



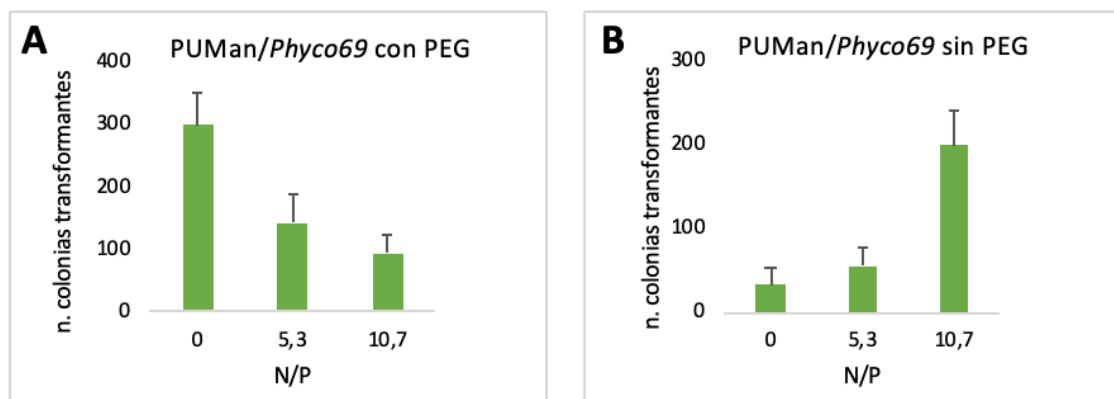
**Figura 17.** Imágenes topográficas de AFM de disoluciones de PUMan/*Phyco69* con distinto rango de N/P en HEPES 10 mM pH 7,4. Los poliplejos de adsorbieron sobre una superficie de mica modificada con APTES.

Como puede verse, para una relación N/P=0 (ausencia de polímero catiónico), el plásmido *Phyco69* adopta una conformación extendida, de acuerdo con lo esperado para una conformación B de un ácido nucleico de doble hebra. Sin embargo, a medida, que la relación N/P va aumentando, se observa una compactación gradual del plásmido, hasta llegar a formar estructuras compactas de forma globular. Así, para un valor de N/P=64,3 se puede observar una compactación completa del *Phyco69*, lo que apoya la hipótesis realizada con los resultados de dicróismo circular.



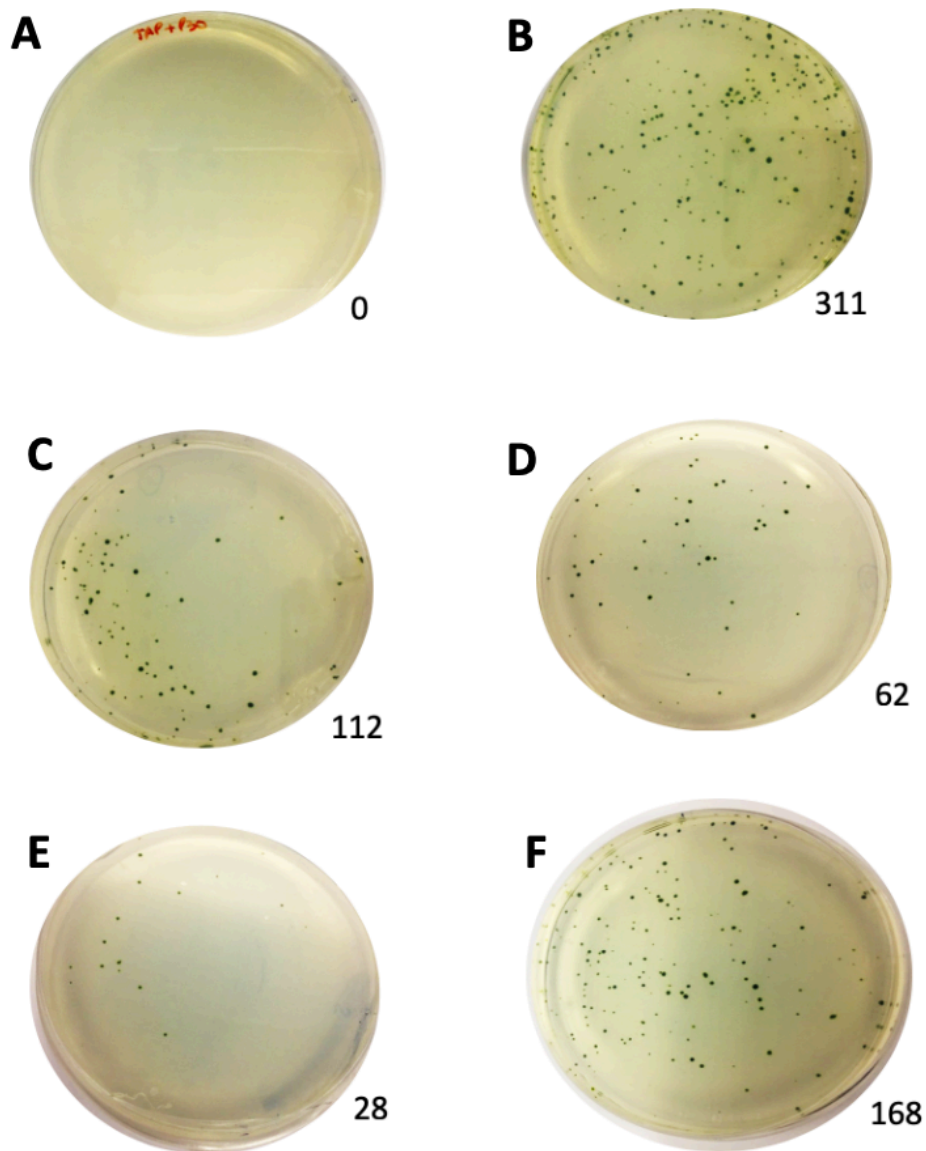
#### 4.4. Ensayos de Ingeniería genética: Transformación genética de *C. reinhardtii*.

En base a los resultados obtenidos en los ensayos de caracterización fisicoquímica de los poliplejos formados, se diseñó y ejecutó un protocolo de transformación genética de *C. reinhardtii*. Para ello se eligieron valores de N/P de 5,3 y de 10,7, que corresponderían a un poliplejo ligeramente negativo y ligeramente positivo, respectivamente. Los experimentos, además, se han realizado en presencia y ausencia de polietilenglicol (PEG) (Figura 18), que es un poliéter que aumenta la estabilidad de los poliplejos formados y facilita la liberación del material genético en el interior de la célula.



**Figura 18.** Número de colonias transformantes obtenidas tras las transformación de *C.reinhardtii*. A) PUMan/Phyco69 en presencia de PEG; B) PUMan/Phyco69 en ausencia de PEG. Cada medida corresponde al valor medio de tres medidas.

Como se observa en la Figura 18.A, al realizar la transformación genética utilizando PEG en ausencia de PUMan, se obtiene un número elevado de colonias transformantes (Ver Figura 18.B) Sin embargo, al realizar el mismo ensayo pero añadiendo además polímero catiónico, el número de colonias transformantes se va reduciendo gradualmente a medida que aumenta el rango N/P. La Figura 18.B, muestra que al realizar la transformación en ausencia de PEG, se observa el efecto contrario, ya que se obtiene mayor cantidad de colonias transformantes conforme va aumentando el valor N/P. A la luz de estos resultados parece ser que la presencia simultánea de PEG/PUMan tiene un efecto antagonista en términos de eficiencia en el proceso de transformación de *C.reinhardtii*.



**Figura 19.** Placas de colonias transformantes de *C.reinhardtii*. A) Control negativo; B) Control positivo; C) N/P 5,3 PUMan/*Phyco69* con PEG; D) N/P 10,7 PUMan/*Phyco69* con PEG; E) N/P 5,3 PUMan/*Phyco69* sin PEG; F) N/P 10,7 PUMan/*Phyco69* sin PEG.

En la Figura 19 se muestran resultados concordantes con los mostrados en la Figura 19. La presencia simultánea de PEG y PUMan no favorece el proceso de transformación. De hecho, al aumentar la concentración de PUMan, manteniendo constante la concentración de PEG, se pasa de obtener 112 colonias transformantes (19.C) a 28 colonias transformantes (19.E). Sin embargo, en ausencia de PEG el número de colonias es directamente proporcional de la cantidad de PUMan. En el intervalo de N/P estudiado, se pasa de 62 colonias transformantes (19.D) a 168 colonias transformantes (19.F) al aumentar N/P.

## 5. Conclusiones.

A raíz de los estudios realizados se puede concluir que:

- La fitotoxicidad del polímero catiónico PUMan es baja, comprobándose la inocuidad de dicho compuesto en el intervalo de concentraciones en el cual se realizarán el resto de los estudios.
- La formación de poliplejos entre el vector polimérico catiónico PUMan y los ácidos nucleicos ADNct y ADNp *Phyco69*, se ha podido demostrar mediante diversas técnicas de caracterización fisicoquímica.
  - a) Los ensayos de potencial Z han mostrado una inversión de la carga superficial de ambos polinucleótidos al ir aumentando la cantidad del vector polimérico catiónico.
  - b) Los resultados de las medidas de fluorescencia y dicroísmo circular indican cambios conformacionales en los ácidos nucleicos al aumentar la cantidad de PUMan añadido. En el caso del ADNp *Phyco69*, las imágenes obtenidas mediante AFM corroboran la sucesión de cambios morfológicos que experimenta el ácido nucleico, pasando de una estructura de doble hélice alargada hasta estructuras toroidales más compactas a medida que aumenta la cantidad del vector polimérico PUMan.
- La transformación genética de *Chlamydomonas reinhardtii*, utilizando como vector químico el polímero catiónico PUMan (formando el poliplejo PUMan/*Phyco69*) y como método físico la agitación con perlas de vidrio, se ha llevado a cabo satisfactoriamente, con una alta eficiencia. La presencia simultánea del polímero PUMan y el PEG parece tener un efecto antagonista, obteniéndose una mayor tasa de colonias transformantes del poliplejo PUMan/*Phyco69* en ausencia de PEG.

## 6. Bibliografía.

- Akthar S. Non-viral cancer gene therapy: Beyond delivery. *Gene Ther.* 2006;13(9):739-40.
- Apt KE, Behrens PW. Commercial developments in microalgal biotechnology. *J Phycol.* 1999; 35: 215-26.
- Avery OT, MacLeod C, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J Exp Med.* 1944; 79(2): 137-58.
- Becker W. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology.* Hoboken (New Jersey): Wiley-Blackwell. 2004.
- Billmeyer FW. *Ciencia de los polímeros.* 1st ed. Barcelona: Reverté. 2004.
- Bishop G, Chaires, J. Characterization of DNA structures by circular dichroism. *Curr Protoc nucleic acid Chem.* 2002; 11(1):7.11.1-7.11.8.
- Chargaff E, Lipshitz R, Green C, Hodes ME. The composition of the desoxyribonucleic acid of salmon sperm. *J Biol Chem.* 1951; 192:223-30.
- Cheraghi R, Alipour M, Nazari M, Hosseinkhani S. Optimization of conditions for gene delivery system based on PEI. *Nanomed J.* 2017; 4(1):8-16.
- Cosa G, Focsaneanu K-S, McLean JRN, McNamee JP, Scaiano JC. Photophysical properties of fluorescent DNA-dyes bound to single- and double-stranded DNA in aqueous buffered solutions. *Photochem Photobiol.* 2004; 73(6):585-99.
- Dinçer S, Türk M, Pişkin E. Intelligent polymer as nonviral vectors. *Gene Ther.* 2005; 1:S139-45.
- Ferreira G. Chromatographic approaches in the purification of plasmid DNA for therapy and vaccination. *Chem Eng Technol.* 2005; 28(11):1285-94.
- Garbett NC, Ragazzon PA, Chaires JOB. Circular dichroism to determine binding mode and affinity of ligand-DNA interactions. *Nat Protoc.* 2007; 2(12):3166-72.
- Glover DJ, Lipps HJ, Jans DA. Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *Nat Rev Genet.* 2005; 6(4):299-310.
- Gwan Park T, Hoon Jeong J, Wan Kim Sung. Current status of polymeric gene delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006; 58(4):468-87.

- Han S, Mahato RI, Sung YK, Kim SW. Development of biomaterials for gene therapy. *Mol Ther.* 2000; 2(4):302-18.
- Holmen SL, Vanbrocklin MW, Eversole RR, Stapleton SR, Ginsberg LC. Efficient lipid-mediated transfection of DNA into primary rat hepatocytes. *Cell Dev Biol Anim.* 2014; 30(5):347-51.
- Hunter J. Further observations on subcortically induced epileptic attacks in unanesthetized animals. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1950; 2(2): 193-201.
- Karp G, Iwasa J, Marshall W. *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments.* 8<sup>a</sup> ed. San Diego: Wiley. 2015.
- Khatoon N, Pal R. *Microalgae in biotechnological application: A commercial approach.* Luxembourg: Springer. 2015.
- Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: The present and the future. *Anal Bioanal Chem.* 2010; 397(8):3173-8.
- Lepecq JB, Paoletti C. A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. Physical-Chemical characterization. *J Mol Biol.* 1967; 27(1):87-106.
- Mehier-Humbert S, Guy RH. Physical Methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005; 57(5):733-53.
- Meka VS, Sing MKG, Pichika MR, Nali SR, Kolapalli VRM, Kesharwani P. A comprehensive review on polyelectrolyte complexes. *Drug Discov Today.* 2017; 22(11): 1697-1706.
- Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, Harris EH, Karpowicz J, Witman GB, et al. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science.* 2007; 318(5848):245-50.
- Mishra A, Ekka MK, Maiti S. Influence of ionic liquids on thermodynamics of small molecule-DNA interaction: The binding of Ethidium bromide to Calf Thymus DNA. *J Phys Chem B.* 2006; 120(10):2691-700.
- Muñoz-Úbeda M, Misra SK, Barrán-Berdón AL, Aicart-Ramos C, Sierra MB, Biswas J, et al., Why is less cationic lipid required to prepared lipoplexes from plasmid DNA than linear DNA in gene therapy?. *J Am Chem Soc.* 2011; 135(45):18014-7.

- Nanowizard AFM Handbook. 2004 [Consultado en Febrero 2019]. Disponible en: <http://www.nanophys.kth.se/nanophys/facilities/nfl/afm/jpk/manuf-manuals/handbook-2.2a.pdf>
- Nelson DL, Cox MM. Lehninger: Principios de Bioquímica. 5ª ed. Barcelona: Omega. 2007.
- Nicholson JW. Chemistry of Polymers. 3rd ed. Cambridge: RSC publishing. 2006.
- Ozluer C, Kara HES. In vitro DNA binding studies of anticancer drug idarubicin using spectroscopic techniques. J Photochem Photobiol B Biol. 2014; 138:36-42.
- Pack DW, Hoffman AS, Pun S, Stayton PS. Design and development of polymers for gene delivery. Nat Rev Drug Discov. 2005; 4(7):581-93.
- Pfeifer A, Verma IM. Gene therapy: promises and problems. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2001; 2:177-211.
- Pratheesh PT, Vineetha M, Kurup GM. An efficient protocol for the Agrobacterium-mediated genetic transformation of microalga Chlamydomonas reinhardtii. Mol Biotechnol. 2014; 56(6):507-19.
- Ranjbar B, Gill P. Circular dichroism techniques: Biomolecular and nanostructural analyses – a review. Chem Biol Drug Des. 2009; 74(2):101-20.
- Recillas-Targa F. Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals. Mol Biotechnol. 2006; 34(3):337-54.
- Romero-Azogil L. Síntesis de polímeros sensibles al medio para aplicaciones biomédicas y farmacéuticas (Tesis doctoral). Universidad de Sevilla, Sevilla. 2018.
- Scaife MA, Nguyen G, Rico J, Lambert D, Helliwel KE, Smith AG. Establishing Chlamydomonas reinhardtii as an industrial biotechnology host. Plant J. 2015; 82(3):532-46.
- Schaffer DV, Lauffenburger DA. Optimization of cell surface binding enhances efficiency and specificity of molecular conjugate gene delivery. J Biol Chem. 1998; 273(43):28004-9.
- Scranton MA, Ostrand JT, Fields FJ, Mayfield SP. Chlamydomonas as a model for biofuels and bio-products production. Plant J. 2015; 82(3):523-31.

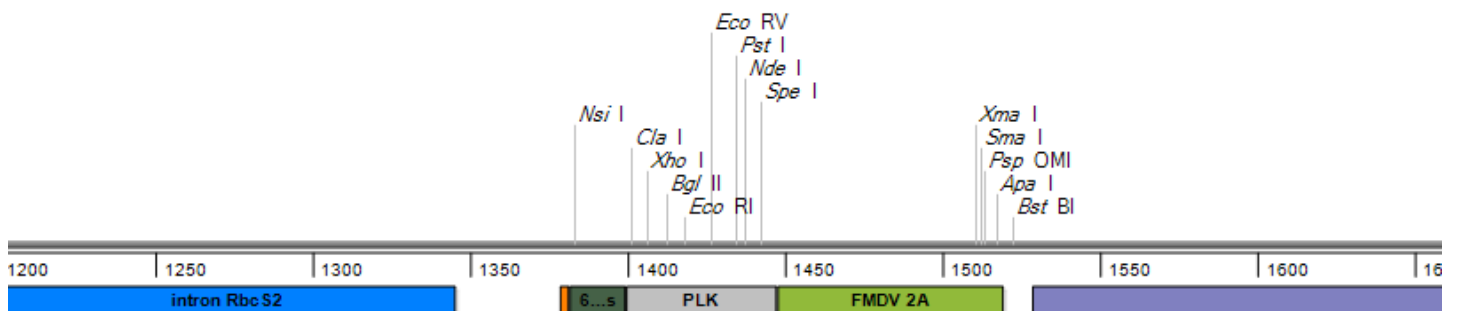
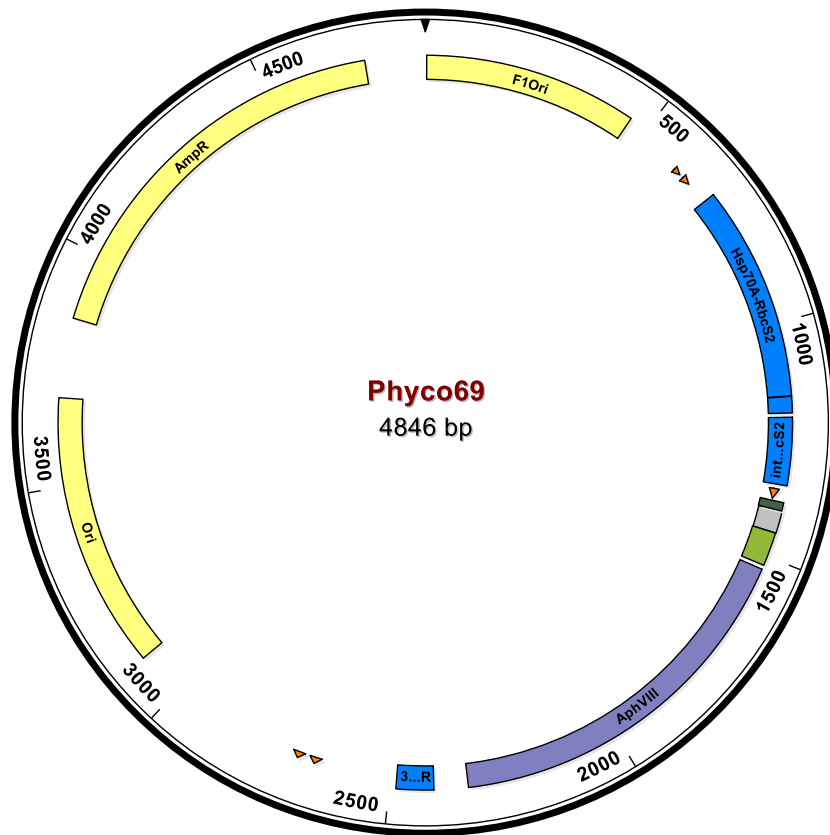
- Skoog AD, West MD, Holler FJ, Crouch RS. Fundamentals of Analytical Chemistry. 8th ed. Toronto:Thompson books. 2004.
- Slivac I, Guay D, Mangion M, Champeil J, Gaillet B. Non-viral nucleic acid delivery methods. *Expert Opin Biol Ther.* 2016; 17(1):105-15.
- Stern DB, Witman G, Harris EH. The Chlamydomonas sourcebook. 2nd ed. Cambridge (Massachusetts):Academic Press. 2008.
- Tang MX, Szoka FC. The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Ther.* 1997; 4(8):823-32.
- Tymms MJ, Schenborn ET, Goiffon V. DEAE-Dextran transfection of mammalian cultured cells. *Transcr Factor Protoc.* 2003; 130(7):147-54.
- Vacik J, Dean BS, Zimmer WE, Dean DA. Cell-specific nuclear import of plasmid DNA. *Gene Ther.* 1999; 6(6):1006-14.
- Vijayanathan V, Thomas T, Thomas TJ. DNA nanoparticles and development of DNA delivery vehicles for gene therapy. 2002; 41(48):14085-94.
- Walther W, Stein U. Gene therapy of solid cancers: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology). 1st ed. New York City: Humana Press. 2015.
- Watson J, Crick F. Molecular structure of nucleic acids. *Nature.* 1953; 171(4356):737-8.
- Yan N, Fan C, Chen Y, Hu Z. The potential of microalgae as bioreactors to produce pharmaceutical. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(6):1-25.
- Zaman Khan Khattak J, Rauf S, Anwar Z, Mustatab Wahedi H, Jamil T. Recent Advances in Genetic Engineering – A Review. *J Biol Sci.* 2012; 4(1):82-90.
- Zetasizer Nano SeriesManual. 2004[Consultado en Febrero 2019]. Disponible en: [http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer\\_Nano\\_user\\_manual\\_Man0317-1.1.pdf](http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf)
- Zhang G, Hu X, Fu P. Spectroscopic studies on the interaction between carbaryl and calf thymus DNA with the use of ethidium bromide as a fluorescence probe. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2012; 108:53-61.

- Zhu J, Chen L, Dong Y, Li J, Liu X. Spectroscopic and molecular modeling methods to investigate the interaction between 5-Hydroxymethyl-2furfural and calf thymus DNA using ethidium bromide as a probe. *Mol Biomol Spectrosc*. 2014; 124-78-83.



# **ANEXOS**

# Anexo I (AI). Plásmido *Phyco69*:



## **Anexo II (AII). Desglose de Figuras:**

**Figura 1:** Representación esquemática del ADN: a) Fragmento lineal, con bucle cerrado y con topologías superenrollada; b) ADN plasmídico superenrollado.

**Figura 2:** a) Distintos vectores que pueden ser utilizados para introducir ácidos nucleicos en el interior celular; b) Propiedades óptimas que deben presentar los vectores diseñados sintéticamente para optimizar los ensayos de terapia génica.

**Figura 3:** Representación esquemática de la formación de complejos vector polimérico catiónico/ácido nucleico.

**Figura 4:** Incremento del uso de *C.reinhardtii* como sistema modelo en biología molecular.

**Figura 5:** Diagrama esquemático de los dos modelos de Transfección en función de la duración temporal.

**Figura 6:** Poliuretano derivado de Manitol (PUMan).

**Figura 7:** a) Representación gráfica de la variación del valor de Potencial Z en función de pH; b) Representación esquemática de una celda de medida de potencial Z.

**Figura 8:** Proceso detallado de la preparación de muestras para la visualización mediante AFM.

**Figura 9:** Ensayo de fitotoxicidad de *Chlamydomonas reinhardtii* en presencia del polímero catiónico PUMan tras un tiempo de exposición de 1 semana.

**Figura 10:** Variación de  $I/I_0$  a una  $\lambda_{589}$  de la sonda fluorescente EB, respecto a la relación N/P (PUMan/ADNct), en tampón HEPES 10 mM, pH 7,4.  $[ADNct]_i=3 \cdot 10^{-5}$  M;  $[EB]_f=2.43 \cdot 10^{-6}$  M; T=298K.

**Figura 11:** Potencial Zeta y tamaño de partícula del complejo PUMan/ADNct a diferentes relaciones N/P (PUMan/ADNct), en tampón HEPES 10 mM, pH 7,4. [ADNct]= $3 \cdot 10^{-5}$  M; T=298K.

**Figura 12:** Espectro de dicroísmo circular del ADNct a distintos rangos de N/P (PUMan/ADNct), en disolución acuosa de HEPES 10 mM, pH 7,4. [ADNct]= $3 \cdot 10^{-5}$  M; T=298K.

**Figura 13:** Variación de I/I<sub>0</sub> a una I<sub>589</sub> de la sonda fluorescente EB, respecto a la relación N/P (PUMan/*Phyco69*), en tampón HEPES 10 mM, pH 7,4. [ADNct]= $3 \cdot 10^{-5}$  M; [EB]= $2.43 \cdot 10^{-7}$  M; T=298K.

**Figura 14:** Poencial Z y tamaño de partícula del complejo PUMan/*Phyco69* a diferentes relaciones N/P (PUMan/*Phyco69*), en tampón HEPES 10 mM, pH 7,4. [ADNct]= $3 \cdot 10^{-5}$  M; T=298K.

**Figura 15:** Electroforesis en gel de agarosa de *Phyco69* digerida con la enzima EcoRI para distintas relaciones N/P.

**Figura 16:** Espectro de dicroísmo circular del ADNct a distintos rangos de N/P (PUMan/*Phyco69*), en disolución acuosa de HEPES 10 mM, pH 7,4. [ADNct]= $3 \cdot 10^{-5}$  M; T=298K.

**Figura 17:** Imágenes topográficas de AFM de disoluciones de PUMan/*Phyco69* con distinto rango de N/P en HEPES 10 mM pH 7,4. Los poliplejos de adsorbieron sobre una superficie de mica modificada con APTES.

**Figura 18:** Número de colonias transformantes obtenidas tras las transformación de *C.reinhardtii*. A) PUMan/*Phyco69* en presencia de PEG; B) PUMan/*Phyco69* en ausencia de PEG. Cada medida corresponde al valor medio de tres medidas.

**Figura 19:** Placas de colonias transformantes de *C.reinhardtii*. A) Control negativo; B) Control positivo; C) N/P 5,3 PUMan/*Phyco69* con PEG; D) N/P 10,7 PUMan/*Phyco69* con PEG; E) N/P 5,3 PUMan/*Phyco69* sin PEG; F) N/P 10,7 PUMan/*Phyco69* sin PEG.