Tesis: "Desarrollo de nanodispositivos mesoporosos híbridos funcionalizados con enzimas para comunicación química avanzada".

Autora: Beatriz de Luis Fernández

Resumen

La presente tesis doctoral titulada "Desarrollo de nanodispositivos mesoporosos híbridos funcionalizados con enzimas para comunicación química avanzada" se centra en el diseño, síntesis y caracterización de varios nanodispositivos híbridos orgánico-inorgánicos utilizando como soporte nanopartículas de sílice mesoporosa equipadas con enzimas y puertas moleculares y que muestran capacidades comunicativas además de la evaluación de diferentes estrategias de comunicación.

El primer capítulo incluye un resumen de diferentes conceptos sobre los que se fundamentan los estudios realizados tales como nanotecnología, materiales de sílice mesoporosa, materiales con puertas moleculares que reaccionan a estímulos específicos, partículas Janus y biocomputación. Finalmente, se incluyen conceptos básicos acerca de la comunicación química, materiales y estrategias empleados hasta ahora y ejemplos representativos.

A continuación, en el segundo capítulo, se presentan los objetivos generales de esta tesis doctoral que son abordados en los siguientes capítulos experimentales.

El tercer capítulo muestra un sistema de biocomputación para liberación basado en nanopartículas Janus de oro-sílice mesoporosa capaces de comunicarse con el entorno procesando la información e imitando la función lógica booleana propia de un demultiplexer y que resulta en la liberación controlada de la carga. En particular, el nanodispositivo está formado por la enzima galactosa deshidrogenasa anclada en el oro mientras que la parte de sílice mesoporosa se carga con un profluoróforo (4-metilumbeliferil-β-*D*-galactopiranósido) y se funcionaliza con una nanoválvula supramolecular que responde a pH (β-ciclodextrina:benzimidazol). La enzima β-galactosidasa unida a la β-ciclodextrina completa el diseño. El nanodispositivo se comporta como un demultiplexer ya que es capaz de leer información molecular del ambiente (lactosa) y producir una respuesta (galactosa + glucosa). Solo en presencia de una especie directora (NAD^+), un segundo producto es generado (ácido galactónico) debido a la cascada concatenada de reacciones enzimáticas que llevan a la liberación y activación de la carga encapsulada. Finalmente se muestra que dicho nanodispositivo puede llevar a cabo sus funciones en medios complejos como en células cancerígenas.

En el cuarto capítulo, se presenta un modelo circular de comunicación dentro de una red de tres nanopartículas diferentes basado en el intercambio jerárquicamente programado de mensajes químicos. La parte mesoporosa del nanodispositivo 1 (**S1**$_{\beta gal}$) es cargada con la especie fluorescente $[Ru(bpy)_3]Cl_2$ y tapada con cadenas de oligo(etilenglicol) que contienen puentes disulfuro y que funcionan como puertas moleculares, mientras que la enzima β-galactosidasa es

unida a la parte del oro. En la nanopartícula 2 (**S2$_{galox}$**), la enzima galactosa oxidasa es inmovilizada en la cara del oro mientras que la sílice mesoporosa es cargada con 4-(bromometil)benzoato de metilo y los poros tapados con un derivado de arilboronato autoinmolante sensible a H_2O_2 que forma un complejo huésped-anfitrión con β-ciclodextrina. Finalmente, el nanodispositivo 3 (**S3$_{est}$**) es funcionalizado con la enzima esterasa en la parte del oro, cargada con la especie reductora hidroclururo de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) en la parte mesoporosa y tapada con una nanoválvula supramolecular que responde a pH (β-ciclodextrina:benzimidazol). El proceso de comunicación se activa en presencia de lactosa (especie de entrada) la cual es hidrolizada por la β-galactosidasa de **S1$_{βgal}$** para generar galactosa (mensajero 1) que es oxidada por la galactosa oxidasa de **S2$_{galox}$** para producir H_2O_2. H_2O_2 abre la puerta molecular de **S2$_{galox}$** liberando el derivado de benzoato (mensajero 2) que es detectado por la esterasa anclada a **S3$_{est}$** y transformada en el correspondiente ácido benzoico. La bajada de pH local induce la apertura de la nanoválvula sensible a pH liberando el TCEP (mensajero 3). El TCEP cierra el círculo y rompe la puerta molecular de **S1$_{βgal}$** que subsecuentemente libera la señal final de fluorescencia.

En el quinto capítulo, se muestra un modelo interactivo de comunicación química entre una nanopartícula Janus abiótica y un organismo vivo (*Saccharomyces cerevisiae*). En particular, el nanodispositivo está basado en nanopartículas funcionalizadas con glucosa oxidasa en la parte del oro, cargadas con el genotóxico fleomicina y tapadas con la puerta molecular sensible a pH (β-ciclodextrina:benzimidazol). El microorganismo usado en el estudio es una levadura modificada que expresa GFP bajo el control del promotor del gen RNR3; la transcripción de dicho gen es inducida con la exposición a agentes que dañan el ADN. La ruta de comunicación interactiva empieza con la adición de sacarosa (estímulo de entrada) la cual es hidrolizada en glucosa por la invertasa localizada en el espacio periplásmico de las levaduras y que difunde al nanodispositivo donde es trasformada en el correspondiente ácido por la glucosa oxidasa de la parte del oro. La bajada local de pH da lugar a la apertura de la nanoválvula sensible a pH del nanovehículo y con ello la liberación de fleomicina (mensaje de vuelta) que induce la expresión de GFP (señal de salida) en las levaduras.

En el sexto capítulo, proponemos una estrategia para establecer una comunicación lineal entre dos microorganismos diferentes que no interactúan entre ellos mediada por un nanodispositivo que actúa como traductor químico. El nanotraductor está basado en nanopartículas mesoporosas de sílice cargadas con el genotóxico fleomicina y tapadas con una puerta molecular sensible al pH (β-ciclodextrina:benzimidazol). Los microorganismos involucrados son bacterias *Escherichia coli* modificadas para expresar β-galactosidasa y levaduras *Saccharomyces cerevisiae* modificadas que expresan GFP ante la exposición a agentes de dañan el ADN ya que su transcripción está controlada por el promotor del gen RNR3. La ruta de comunicación lineal se dispara al añadir lactosa (estímulo de entrada) la cual es detectada e hidrolizada en glucosa y galactosa por las bacterias *E. coli* modificadas para expresar β-galactosidasa. La glucosa (mensajero 1) es entonces trasmitida y detectada por la glucosa oxidasa del nanodispositivo abiótico y oxidada a ácido glucónico induciendo la apertura de la

nanoválvula del contenedor mesoporoso. La fleomicina confinada (mensajero 2) es liberada y difunde a las levaduras *S. cerevisiae* que decodifican la información y activan la transcripción de GFP generando una señal fluorescente.

Finalmente, las conclusiones generales de la presente tesis doctoral son expuestas en el capítulo siete. El estudio de las capacidades comunicativas de los nanodispositivos mesoporosos funcionalizados con enzimas permite la construcción de estrategias de cooperación entre diferentes entidades que permiten funcionalidades que van más allá que aquellas llevadas a cabo por agentes individuales. Esperamos que los resultados obtenidos inspiren aplicaciones futuras en diferentes áreas tales como biomedicina, nanorobots, materiales que imiten la naturaleza y tecnologías de la información.