

ULL

Universidad
de La Laguna



Facultad de Ciencias
Sección BIOLOGÍA



Molecular cloning of antimicrobial peptides

Clonaje molecular de péptidos antimicrobianos

Trabajo Fin de Grado

Crismarys Hernández Ramos

Septiembre, 2015

SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN TRABAJO FIN DE GRADO Curso Académico: 2014/2015	ENTRADA Fecha: Núm:
--	--------------------------------------

Datos Personales


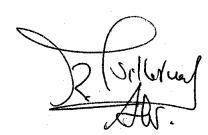
Nº DNI o pasaporte:	Nombre y Apellidos:
54049653 k	Crismarys Hernández Ramos
Teléfono:	Dirección de correo electrónico:
669225717	Cris1904_1@hotmail.com

SOLICITA la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

TÍTULO

Clonaje molecular de péptidos antimicrobianos

Autorización para su depósito, defensa y evaluación

D. José Manuel Pérez de la Lastra Pérez de la Lastra	
Científico titular del Departamento de Agrobiología del IPNA (CSIC)	
y D. Ricardo Guillermo Álvarez	
Profesor del Departamento de Química Orgánica	
autorizan a la solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado	
 Fdo.: José M. Pérez de la Lastra	 Fdo.: Ricardo Guillermo Álvarez

La Laguna, a 2 de Septiembre de 2015

Firma del interesado/a



SR/A. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE GRADO DE LA SECCIÓN DE BIOLOGÍA

Índice

Índice.....	1
Agradecimientos.....	2
Lista de abreviaturas.....	3
Abstract	4
Resumen	4
Introducción	6
Objetivos	10
Materiales y métodos	12
Resultados	15
Discusión.....	25
Conclusiones	27
Conclusions	27
Referencias bibliográficas	28

Agradecimientos

Agradecerle a mi tutor, Ricardo Guillermo Álvarez, por toda la ayuda que he recibido, así como la orientación y la motivación necesaria para afrontar este trabajo.

Mi más sincero agradecimiento a mi tutor del trabajo experimental, José Manuel Pérez de la Lastra, por haberme enseñado y guiado en todo momento, no sólo en el laboratorio, sino también en todos los congresos y actividades a las que he podido asistir; gracias por todo el tiempo que ha dedicado para que pueda concluir este trabajo de fin de grado.

Gracias a mis compañeros de laboratorio, Lidia y David, por acogerme desde el primer momento como una más del equipo, enseñándome y compartiendo conmigo todos sus conocimientos.

Gracias al personal del IPNA-CSIC, por toda la ayuda recibida.

Lista de abreviaturas

AMPs o PAMs (Anti Microbian Peptides o Péptidos Anti Microbianos).

C. reinhardtii (*Chlamydomonas reinhardtii*).

E. coli (*Escherichia coli*).

FDA (Food and Drug Administration)

TFG (Trabajo Fin de Grado)

Abstract

Antimicrobial peptides (AMPs) have taken a great importance in recent biotechnological advances, because of their advantages to kill pathogens and undesirable microorganisms. For this reason the study and application of AMPs is spreading agricultural production and pharmaceuticals, as well as treatments for cancer and human disease. By using *Chlamydomonas reinhardtii*, a microalgae, as biofactory, it seeks to achieve a production of recombinant proteins with the peptide sequences, constructed with bioinformatics techniques, analyzed from different organisms that naturally occurring. In this study we have created two vectors to express the peptides and to extract them in different ways; one associated with an immunoglobulin and the other one associated with a histidine tail. Our results have shown that cloning of the peptides has been effective with the vectors used in addition to successfully integrate in the plasmid DNA from *C. reinhardtii*.

Keywords: Antimicrobial peptides, *Chlamydomonas reinhardtii*, biotechnology, recombinants proteins.

Resumen

La situación actual de resistencia de los microorganismos a los antibióticos convencionales ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas. Los péptidos antimicrobianos, cuya acción protectora han usado los animales durante millones de años, llenan muchos requerimientos que demanda la industria farmacéutica, la agricultura y la producción de alimentos en general. En los últimos años se han intensificado las investigaciones sobre la aplicación de péptidos antimicrobianos naturales, presentes en plantas y animales, como alternativa a los antibióticos convencionales. A pesar de dichos desarrollos, subsiste la necesidad de disponer de nuevos compuestos antimicrobianos que sean activos frente a bacterias patógenas, y que además posean características adicionales apropiadas, como por ejemplo un amplio espectro de acción, toxicidad baja y estabilidad frente a proteasas.

Una vez identificada la secuencia codificante de estos péptidos, se emplean técnicas de biología sintética y de ADN recombinante para modificarlos e introducirlos en microalgas, capaces de producir esas proteínas a gran escala. La microalga *Chlamydomonas reinhardtii* es un excelente modelo debido a su bajo coste de producción, a su cultivo fácil y económico, su gran capacidad para acumular biomasa y a que son generalmente consideradas como inocuas

para el ser humano. Mediante el uso de *Chlamydomonas reinhardtii*, una microalga, como biofactoría. En este estudio hemos creado dos vectores para expresar los péptidos en forma de proteínas de fusión para poder purificarlos de dos maneras distintas; uno asociado a una inmunoglobulina y el otro asociado a una cola de histidinas. Nuestros resultados han mostrado que el clonaje de los péptidos ha sido efectivo con los vectores utilizados, están preparados para integrarse de manera satisfactoria en el DNA plasmídico de *C. reinhardtii*.

Palabras clave: Antimicrobial peptides, *Chlamydomonas reinhardtii*, biotechnology, recombinants proteins.

Introducción

El uso de antibióticos, tanto en protección vegetal, como en clínica o veterinaria, está limitado por la aparición de cepas resistentes de los patógenos causantes de enfermedades. Por ello, es necesario el desarrollo de nuevos antimicrobianos que puedan evitar la resistencia en las bacterias. En los últimos años se han intensificado las investigaciones sobre la aplicación de péptidos antimicrobianos naturales, presentes en plantas y animales, como alternativa a los antibióticos convencionales. A pesar de dichos desarrollos, subsiste la necesidad de disponer de nuevos compuestos antimicrobianos que sean activos frente a bacterias patógenas, y que además posean características adicionales apropiadas, como por ejemplo un amplio espectro de acción, toxicidad baja y estabilidad frente a proteasas.

Los péptidos antimicrobianos (AMPs) han sido identificados en una amplia variedad de organismos, incluyendo arqueobacterias y eubacterias, lo que deja entrever su presencia temprana en la evolución. Forman parte de la inmunidad innata de los seres vivos, los cuales pueden ser considerados antibióticos endógenos y moléculas efectoras. Los AMPs son péptidos de bajo peso molecular (usualmente menores de 10KDa), codificados en el genoma, a diferencia de otros antimicrobianos producidos por acción enzimática, como la penicilina. (Tabla 1).

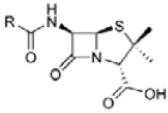

	Conventional antibiotics Enzymatically synthesized compounds	Antimicrobial peptides Ribosomal gene-encoded peptides
Examples ¹		
Molecular characteristics	Penicillin Small compounds <2000 Da, easy to synthesize with lower production cost	Canine cathelicidin Canine β -defensin-1 Small amphipathic peptides <10 kDa, feasible to synthesize with higher production cost
Antimicrobial spectrum	Most are active against a subclass of microbes with low side effects	Most are broadly active and multifunctional with potential side effects
Primary mechanism of action	Metabolic inhibition, easy to develop bacterial resistance	Plasma membrane disruption, hard to develop bacterial resistance
Application	Conventional antibiotic therapies	Prebiotics, probiotics; transgenic animals; new generation of antibiotics

Tabla 1 Comparativa de los antibióticos enzimáticos convencionales (penicilinas) frente a los péptidos antimicrobianos (catelicidinas).

Típicamente, los AMPs son moléculas catiónicas debido a su alto contenido de aminoácidos como lisina y arginina. Estructuralmente son anfipáticos, lo que les concede estabilidad en

ambientes tanto acuosos como hidrofóbicos (Fig.1). Su principal mecanismo de acción consiste en la desestabilización de la membrana celular. Estos compuestos poseen una amplia diversidad en cuanto a su actividad biológica, puesto que son activos contra patógenos que incluyen bacterias, hongos, virus y protozoarios. Su espectro de actividad es medianamente específico para cada péptido, de tal manera que la sola sustitución en un residuo podría alterar su funcionalidad. Normalmente, la actividad antimicrobiana directa presente en los animales se relaciona con la expresión de los péptidos antimicrobianos, a diferentes niveles bajo condiciones fisiológicas, y éstas actividades constituyen la primera línea de defensa inmunitaria, especialmente en aquellos sitios donde los péptidos antimicrobianos se encuentran en altas concentraciones, como en los gránulos de las células fagocíticas o en las criptas del intestino delgado.

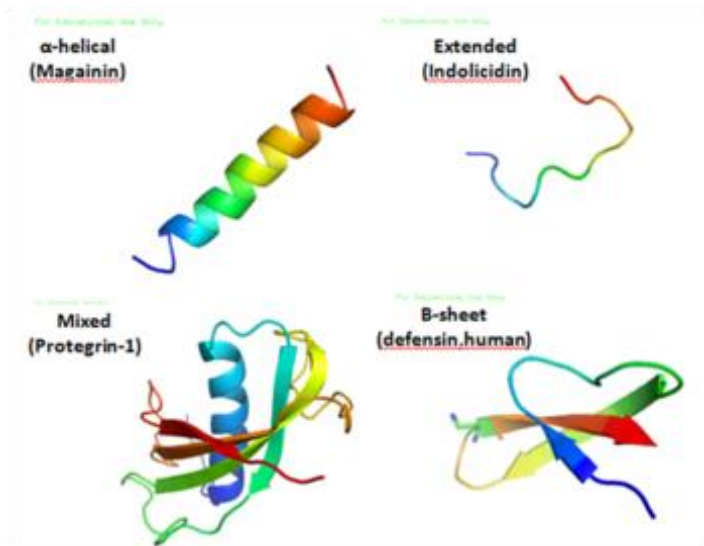


Figura 1 Estructura de los péptidos antimicrobianos

La situación actual de resistencia de los microorganismos a los antibióticos convencionales ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas. Los péptidos antimicrobianos, cuya acción protectora han usado los animales durante millones de años, llenan muchos requerimientos que demanda la industria farmacéutica, la agricultura y la producción de alimentos en general. La variedad de propiedades antimicrobianas, sus propiedades físicas y el éxito evolutivo, hacen de estos péptidos sustancias ideales para el desarrollo de futuras aplicaciones terapéuticas. Actualmente, existen bases de datos con más de 2000 secuencias de péptidos antimicrobianos, nativos y sintéticos. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de péptidos descritos en diversos organismos y de los avances para aprovechar su potencial clínico, no existe actualmente ningún péptido aprobado para uso en humanos por la Food and Drug Administration (FDA).

El presente TFG se ha realizado en el marco de un proyecto financiado por el Ministerio para la producción de péptidos antimicrobianos (SAF2013-48399). El objetivo de este proyecto es descubrir péptidos antimicrobianos, más selectivos, menos tóxicos y con un menor impacto medioambiental, que puedan ser de utilidad en medicina y/o agricultura. Dado que en el genoma de cada especie existen péptidos antimicrobianos propios de la interacción de cada especie con su ambiente y patógenos específicos, se usaron herramientas bioinformáticas para rastrear los genomas de especies que se encuentran constantemente expuestos al ambiente e identificar potencial péptidos antimicrobianos. Recientemente, el equipo investigador del grupo de Biotecnología de macromoléculas (IPNA) ha descubierto una serie de péptidos antimicrobianos, procedente de diversos animales, entre los que destacan catelicidinas de mamíferos marinos, terrestres y voladores, así como de reptiles y aves (Tabla 2).

Péptido	Especie	Carga neta	Hidrof.	Índice Boran	Estructura
Tt_FR-28	Delfín (<i>Tursiops truncatus</i>)	+7	25%	2.67 kcal/mol	P-rich
Am_TR-26	Caimán (<i>Alligator mississippiensis</i>)	+5	46%	1.75 kcal/mol	a-helix
Cp_SP-37	Tortuga pintada (<i>Chrysemys picta bellii</i>)	+9	24%	2.59 kcal/mol	a-helix
Cp_RR-33	Tortuga pintada (<i>Chrysemys picta bellii</i>)	+13	33%	3.9 kcal/mol	a-helix
Ml_LN-35	Murciélago (<i>Myotis lucifugus</i>)	+8	40%	1.33 kcal/mol	a-helix
Ml_RF-32	Murciélago (<i>Myotis lucifugus</i>)	+4	31%	2.38 kcal/mol	a-helix
Cc_PT-33	Topo de nariz estrellada (<i>Condylura cristata</i>)	+2	24%	2.34 kcal/mol	a-helix
Cc_KL-41	Topo de nariz estrellada (<i>Condylura cristata</i>)	+6	31%	2.42 kcal/mol	a-helix
Tm_KR-41	Manatí (<i>Trichechus manatus latirostris</i>)	+7	26%	2.92 kcal/mol	a-helix
Od_QR-42	Degú (<i>Octodon degus</i>)	+11	28%	3.05 kcal/mol	a-helix
Vp_GF-35	Alpaca (<i>Vicugna pacos</i>)	+3	37%	1.88 kcal/mol	a-helix
Pv_KS-16	Zorro volador (<i>Pteropus vampyrus</i>)	+2	43%	2.26 kcal/mol	a-helix
Et_KR-42	Erizo (<i>Echinops telfairi</i>)	+4	30%	3.17 kcal/mol	a-helix
Ef_KF-43	Murciélago (<i>Eptesicus fuscus</i>)	+7	30%	3.46 kcal/mol	a-helix
Mp_SK-38	Hurón (<i>Mustela putorius furo</i>)	+8	26%	3.64 kcal/mol	a-helix
Ca_KR-38	Topo dorado del Cabo (<i>Chrysochloris asiatica</i>)	+8	31%	2.99 kcal/mol	a-helix
Mm_LV-34	Periquito (<i>Melospittaacus mudulatus</i>)	+10	38%	3.16 kcal/mol	a-helix
Mm_KR-26	Periquito (<i>Melospittaacus mudulatus</i>)	+5	50%	0.65 kcal/mol	a-helix

Tabla 2 Relación de péptidos antimicrobianos identificados en diversos mamíferos, aves y reptiles.

Las catelicidinas son un grupo estructuralmente heterogéneo de moléculas antimicrobianas presentes en algunas especies de mamíferos que están codificadas en genes formados por tres intrones y cuatro exones. No obstante únicamente es funcional el dominio de antimicrobiano codificado en el último exón, puesto que son sintetizadas como prepropéptidos (Figura 2), cuyo procesamiento consiste en la eliminación proteolítica del propéptido tras la degranulación de neutrófilos.[18]

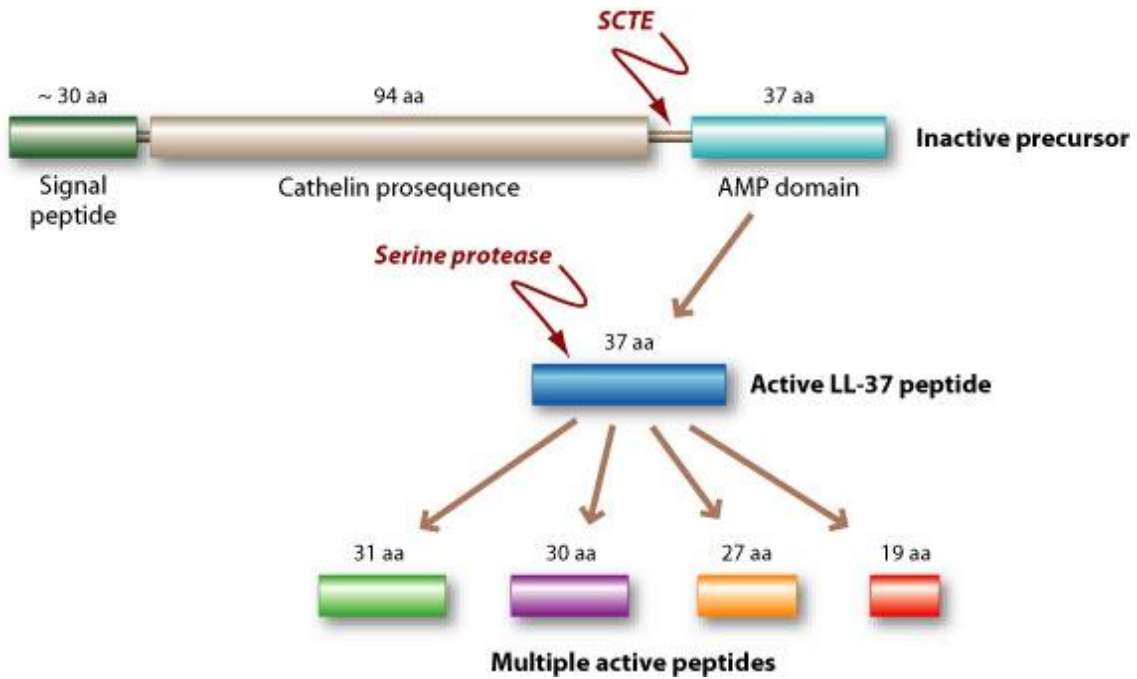


Figura 2 Ejemplo de catelidicina.

Una vez identificada la secuencia de estos péptidos, se emplean técnicas de biología sintética y de ADN recombinante para modificarlos e introducirlos en microalgas, capaces de producir esas proteínas a gran escala. La microalga *Chlamydomonas reinhardtii* es un excelente modelo debido a su bajo coste de producción, a su cultivo fácil y económico, su gran capacidad para acumular biomasa y a que son generalmente considerados como inocuos para el ser humano. Todo ello hace de *C. reinhardtii* un sistema particularmente atractivo para la expresión de proteínas recombinantes. (Figura 3). Finalmente, se purifican los compuestos recombinantes a partir de las células y se analiza su actividad antimicrobiana in vitro e in planta.

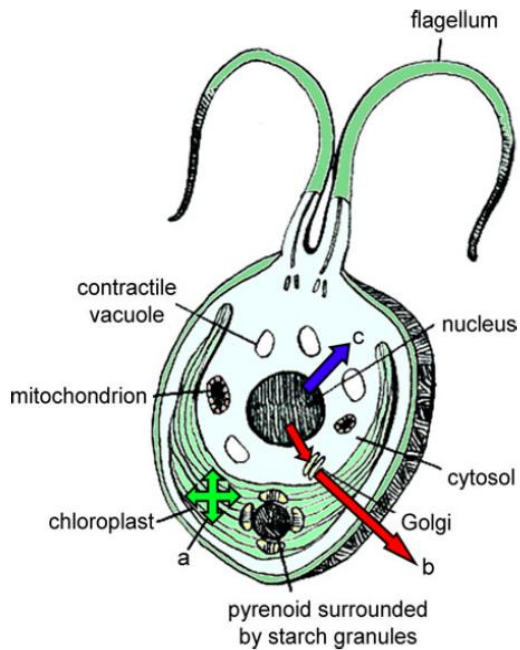


Figura 3 Esquema de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, donde se muestra el tipo de transformación que resulta factible realizar: cloroplastos (a), nuclear con expresión extracelular (b) y nuclear con expresión intracelular (c).

Objetivos

Los péptidos antimicrobianos desarrollados en el IPNA a partir de animales tan diversos como mamíferos, aves y reptiles, son totalmente novedosos y de gran potencial como agentes antimicrobianos. Sin embargo, la reducida estabilidad de estos péptidos antimicrobianos hace necesario el desarrollo de proteínas de fusión, mediante técnicas de biología molecular e ingeniería genética que, además de abaratar considerablemente su estabilidad, permiten una rápida y eficaz purificación, lo que los hace idóneos como agentes antimicrobianos de valiosa utilidad en sanidad, veterinaria, cosmética, acuicultura, etc.

Para este trabajo se han tomado como referencia las catelicidinas procedentes de las especies *Alligator mississippiensis* (caimán) y *Chrysemys picta belli* (tortuga pintada); cuya forma de vida en aguas con una alta actividad bacteriana, puede influir en el desarrollo evolutivo de mecanismos de defensa, tales como los péptidos antimicrobianos.

Objetivos principales:

Partiendo de la secuencia de estos péptidos se desarrollarán proteínas de fusión basadas en dos tipos de construcciones: como inmunoadhesinas, conteniendo la parte Fc de la IgG humana, y con colas de histidina (Figuras 4 y 5).

Estas proteínas de fusión ofrecen una serie de ventajas: como es su mayor estabilidad, facilidad de purificación y posibilidad de ser manipulados para producir moléculas bivalentes o monovalentes [10].

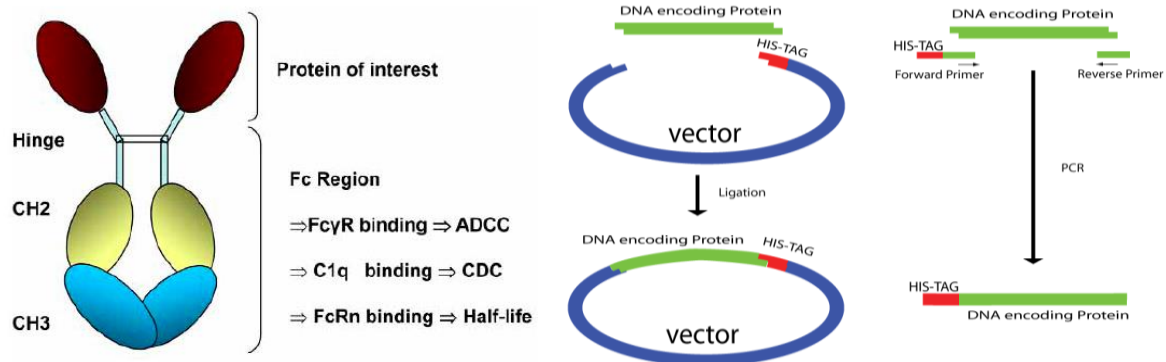


Figura 4 y 5 Esquema de una inmunoadhesina que contiene una proteína de interés y la región Fc de la inmunoglobulina humana IgG1. Esquema de una proteína de fusión con colas de histidina.

Concretamente, para este trabajo se plantearon una serie de objetivos particulares, tales como:

1. Diseño y creación de vectores de expresión adecuados para la generación de proteínas de fusión (uno conteniendo la porción Fc de la IgG humana y otro conteniendo una cola de histidinas) a partir de un vector comercial para microalgas.
2. Clonaje molecular de ADN sintético codificante para péptidos antimicrobianos en dichos vectores de expresión.
3. Purificación de los plásmidos recombinantes y secuenciación para verificar su correcto clonaje.
4. Transformación de microalgas con las construcciones sintéticas.

Materiales y métodos

Microorganismos

Los microorganismos empleados en este estudio fueron *Escherichia coli* cepa DHA5 alfa, (cultivada en medio LB) y la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, cepa c137, ambas de Life Sciences. Además también se usó la cepa c3395 de *Chlamydomonas*, deficiente en la pared celular, procedente del repositorio de *Chlamydomonas* de la Universidad de Minnesota, en EEUU (www.chlamycollection.org).

Cultivo de microalgas

El cultivo de microalgas requería previamente de un proceso de descongelado de las mismas, ya que se conservan en criocongelación a -80 °C. Se utilizaron las cepas c137 salvaje y la cepa c3395 sin pared. Ambas cepas se cultivaron en medio TAP (Invitrogen) y se incubaron en una cámara de cultivo SANYO environmental test chamber modelo MLR 352 H, a 36 °C de temperatura y una humedad del 50%, e iluminación en posición 3. En el interior de la cámara las microalgas se incubaron en erlenmeyers de 100 a 250 mL en agitación suave a 70-100 r.p.m.

Secuencias de péptidos antimicrobianos

En este trabajo se utilizó la catelicidina procedente de *Alligator mississippiensis* (caimán), con número de acceso Genbank: XP_0066262491.1 y la catelicidina de *Chrysemys picta bellii* (tortuga pintada), con número de acceso Genbank: XP_005295170.1.

Para el diseño de los péptidos antimicrobianos, se tomó la secuencia del cuarto exón, que es el que codifica para el péptido antimicrobiano.

Am_TR-26: TRWLWLLRGGLKAAGWGIRAHNLNRNQ

Cp_SP-37: SPRRSRWPRRWYLPGSYTLIAHGGGKGGKGGKGSRLQMA

Material genético de partida

Las secuencias de ADN de las catelicidinas se diseñaron a partir de las correspondientes secuencias de aminoácidos usando la plataforma DNA 2.0 (www.dna20.com). Las secuencias de las catelicidinas fueron sintetizadas por Genscript (www.genscript.com) con la optimización de codones para *Chlamydomonas*.

Vector de partida

El clonaje de péptidos antimicrobianos en *C. reinhardtii* se realizó partiendo de un vector comercial pChlamy_4 de la casa Invitrogen (www.invitrogen.com). Este plásmido cuenta con múltiples características que lo hacen interesante a la hora de facilitar el proceso de expresión de las secuencias de interés. (Figura 6).

Promotor Hsp70A-Rbc S2. Es un promotor híbrido constitutivo consistente en los promotores Hsp70 y Rbc S2 para una expresión fuerte de los genes de interés.

Intrón-1 Rbc S2. Es el primer intrón de la subunidad pequeña de la ribulosa bifosfatasa carboxylasa (rbcS2); necesaria para el mantenimiento de la alta expresión del gen de interés.

Gen de resistencia a la Zeocina™ (She ble). Es un gen de resistencia a la bleomicina-Zeocina natural de *Streptoalloteichus hindustanus*, que permite la selección en *Chlamydomonas reinhardtii*.

Secuencia peptídica FMDV 2A. “Foot-and-mouth disease-virus” (FMDV) 2A es un péptido relacionado con la expresión de transgénicos mediante una auto-inhibición de la reacción

Tres sitios de clonaje múltiple (de las siglas en inglés MCS 1-3) con siete únicas secuencias de reconocimiento a enzimas de restricción (**EcoRI, XhoI, KpnI, BamHI, Bgl II, XbaI, PstI**). Permite la inserción del gen dentro del vector pChlamy_4 con flexibilidad de incluir cualquiera o ambas o ninguna de los N-terminal y C-terminal tags.

V5 epitopos (Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr). Permite la purificación de la proteína de fusión en resinas con quelantes metálicos.

Sitio de reconocimiento TEV. Permite a la proteasa dependiente de escisión de la cola de seis Histidinas formar la proteína recombinante tras la purificación.

Extremo 3' UTR del gen RbcS2. Asegura la correcta terminación de la transcripción; el 3' UTR puede contener secuencias que regulan la eficiencia de la traducción, estabilidad del mRNA, y la señal de poliadenilización.

Gen de resistencia a la Ampicilina (bla). Permite la selección de los plásmidos en *E.coli*.

Promotor bla. Permite la expresión de los genes de resistencia a la Ampicilina.

Origen pUC. Permite la alta replicación de copia y el crecimiento en *E. coli*.

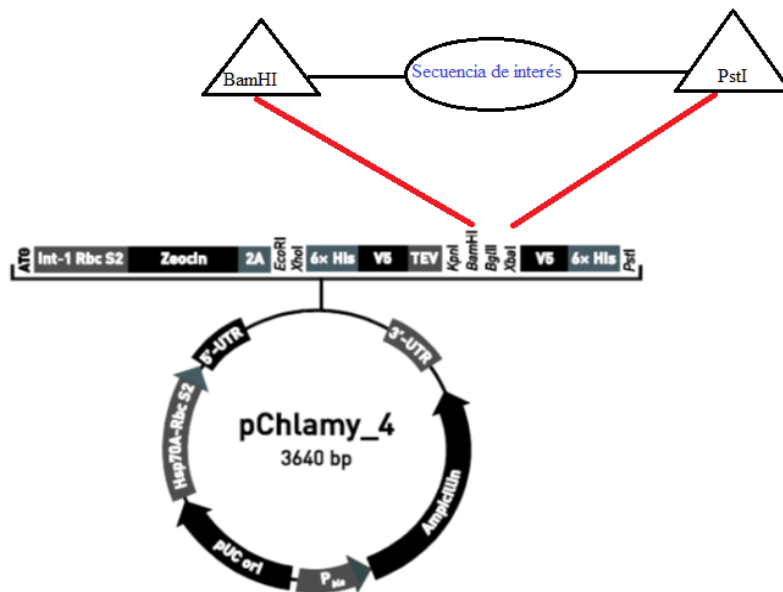


Figura 6 Esquema representativo del vector pChlamy_4 con las enzimas utilizadas para introducir la secuencia de interés.

Enzimas de restricción, marcadores de tamaño y otros kits de biología molecular

Todas las enzimas de restricción fueron de Fermentas (ThermoFisher). Los marcadores de tamaño molecular fueron Generuler 1Kb y 0'Generuler de Fermentas (ThermoFisher). Los kits de biología molecular empleados en este estudio fueron el kit GeneArt de Expresión de Proteínas en *Chlamydomonas* (Invitrogen). Los de minipreparación de ADN plasmídico (Mini-prep) de Fermentas (ThermoFisher). GeneClean II (de MP Biomedicals) para la purificación de DNA a partir de una banda aislada en un gel de agarosa, kit de PCR (Genscript) y de ligación (Rapid DNA ligation kit), de Fermentas (ThermoFisher). Para purificar el DNA tras la digestión enzimática se usó el MicroElute DNA Clean Up Kit (Omega).

Cuantificación de ADN. La cuantificación de DNA se realizó en el espectrofotómetro Maestronano (MaestroGen), usando 2 μ L de muestra.

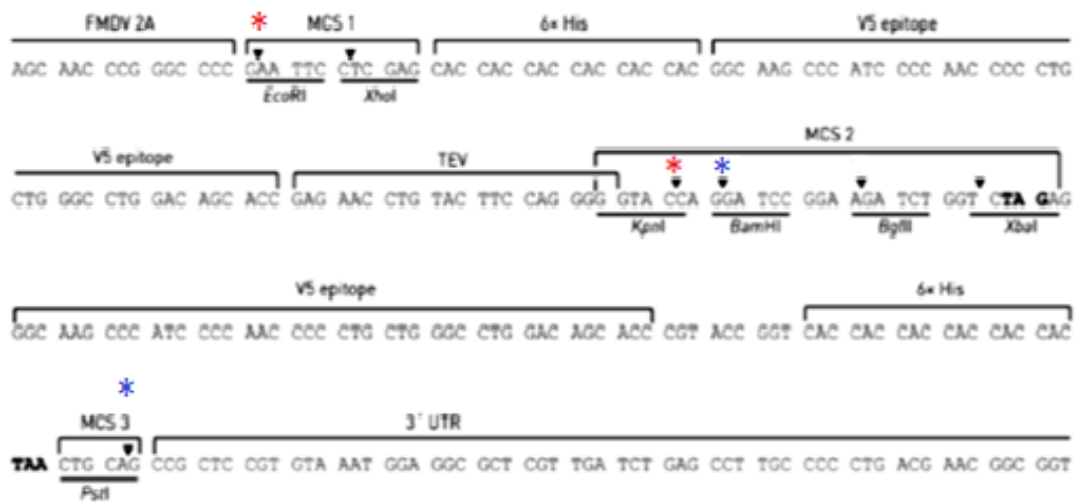
Resultados

En este apartado se describen, junto con los resultados, las estrategias y los procedimientos empleados para el clonaje molecular de las catelicidinas empleadas en este trabajo.

Modificación del vector pChlamy_4 para incluir proteína de fusión

El vector de partida pChlamy_4 fue modificado adecuadamente para que, una vez clonadas las secuencias de los péptidos antimicrobianos, diese lugar a dos tipos de proteínas de fusión: una inmonoadesina, que contiene la porción Fc de la inmonoglobulina G humana y otra proteína de fusión con una cola de seis histidinas en su extremo C-Terminal. La generación de inmonoadesinas con la porción Fc nos permitirá, entre otras propiedades, purificarla mediante columnas de proteína A o proteína G [19], mientras que las proteínas de fusión con colas de His nos permitirá purificar las proteínas de fusión resultantes mediante columnas de Ni.

Utilizando diferentes enzimas de restricción se modificó el vector pChlmay_4 para crear tanto el vector pFc como el vector pHis. (Figura 7). En ambos casos, en el diseño del DNA sintético que codifica para los péptidos antimicrobianos se añadieron los sitios para las enzimas de restricción EcorRI y KpnI, ya que éstas estaban presentes en el sitio de clonaje múltiple (MCS) del vector y previamente comprobamos que estas enzimas no cortaban a los inserto.



Enzimas pFc
Enzimas pHis

Figura 7 Enzimas de restricción utilizadas para crear los vectores pHis y pFc.

Diseño del vector pFc

El gen sintético correspondiente a la porción Fc de la IgG humana que venía originalmente en un plásmido pUC57 debía ser liberado e introducido en el vector pChlamy_4. Para obtener la proteína de fusión con la porción Fc de la IgG humana, teníamos que introducir esta porción dentro del vector pChlamy_4 y anular la cola de histidina que se producía en el extremo C-Terminal. Para ello, el DNA sintético de la porción Fc de la IgG se dirigió con las enzimas de restricción ubicadas en los sitios MCS2 Y MCS3 (Figura 7).

Digerimos ambos vectores con las enzimas BamHI y PstI desde el plásmido que contenía el gen sintético Fc-tag para purificar el inserto Fc. Abrimos el pChlamy_4 con las mismas enzimas de restricción para clonar el inserto Fc-tag dentro del vector. Para purificar el inserto Fc se utilizó un gel de agarosa al 1.5%, donde se cortó la banda de interés correspondiente con el inserto A partir de esta banda se purificó el inserto usando el kit GeneClean.

Material de partida utilizado:

pChlamy_4	20 µL a 0.5 µg/µL
pUC57 Fc-tag	4µg

Digestión del plásmido y los vectores

La cuantificación del DNA se toma en un MaestroNano, donde se colocan 2 µL de cada muestra y nos da el resultado de la concentración expresado en ng/ µL. Para ajustar el blanco se utilize el buffer de elución del kit de purificación.

Para la digestion se le añadieron 10 µL de agua a los 4 µg de pUC57 Fc-tag. A partir de ésta, se tomaron 5 µL que contenían 2 µg de DNA.

Mix de reacción

5µl de pUC57 Fc-tag

3 µl de BamHI

3µl de PstI

2µl de Buffer

7µl de H2O

Volumen total de 20 µl

Se introdujeron en el termociclador durante una hora a 37° C.

Por otro lado, se preparó el vector pChlamy_4. Para ello se tomaron 4 µL del vector pChlamy_4 que contenía 2 µg de DNA. Se prepara una mix de reacción que contenía:

Mix de reacción

4µl pChlamy_4
3µl de BamHI
3µL de PstI
2µl de Buffer
8µl de H ₂ O

El producto de la digestión fue sometido a una electroforesis, donde la banda correspondiente a 700 pb fue aislada para su purificación.

La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1.5% en tampón TAE (tris-Acetato-EDTA) conteniendo Gelgreen a una dilución 1/10000 (v/v) para visualizar las muestras y analizar los resultados. Para preparar el gel se pesaron 3 gramos de agarosa enrasados hasta los 200 mL con tampón TAE. Se colocan los peines para formar los pocillos de carga y se deja enfriar el gel. Una vez solidificado, se retira el peine y se cargan las muestras utilizando un cargador que le confiere mayor densidad a las mismas para que ayan al fondo del pocillo y no se contamine el gel; así como favorece la visualización de la misma (Figura 8).

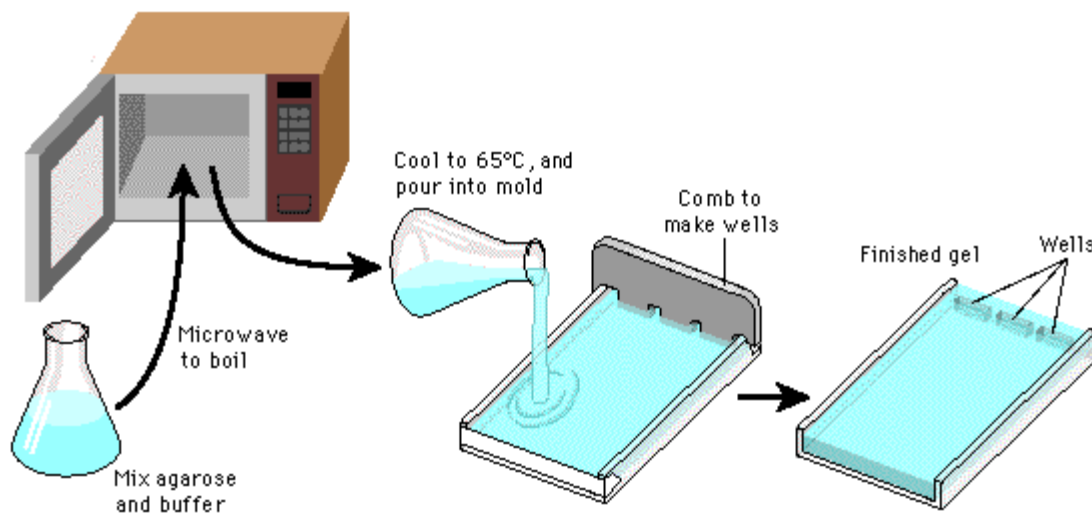
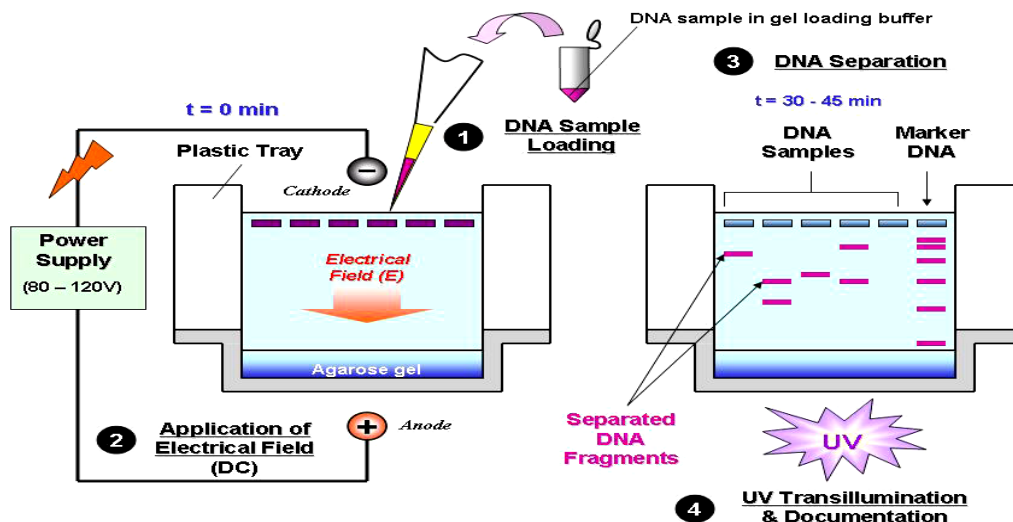


Figura 8 Ilustración de la preparación de un gel de agarosa para electroforesis.

Para correr la electroforesis se utilizó un amperaje de 60 A, durante 25 minutos. Una vez finalizada la electroforesis se colocó un gel en un transiluminador de luz azul que permite visualizar las bandas.



Graphic©ESchmid/2001

Figura 9 Carga de un gel electroforético.

Introducción de los insertos en los vectores pChlamy ya modificados

Ligación del vector

Mix de Ligación

Vector (pHis/pFc)	1 μl
Inserto (#inserto)	2 μl
Buffer 5X	1 μl
Ligasa T4	1 μl
Total	5 μl

El programa de ligación en el termociclador se estableció durante 20 minutos a 22 °C.

Transformación de células competentes de *E.coli*.

Las células competentes DH5 alfa, de *E.coli* se descongelaron en hielo y se tomaron 50 μL de células por cada transformación dentro del tubo eppendorf de 1.5 μL .

Se volvió a congelar cualquier célula que no haya sido utilizada, en hielo seco o baño de etanol durante cinco minutos antes de volver a congelar a -80 °C.

Se añadieron de 1 a 5 μL (1-10 ng) de DNA de las células y se mezclaron suavemente.

Se incubaron los tubos en hielo durante 30 minutos.

Se sometieron a las células a un choque térmico durante 20 segundos en un baño de agua a 42 °C sin agitar.

Se colocaron los tubos en hielo durante 2 minutos.

Se añadieron 950 μL de medio previamente calentado a cada tubo.

Se incubaron los tubos a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante una hora a 225 r.p.m.

Se añadieron 20 μL a 200 μL para cada transformación en placas selectivas previamente calentadas.

Se guardaron las reacciones de transformación

Al día siguiente, sobre las colonias que aparecen en la placa se realizó un PCR screening de colonias. Esta técnica se empleó para identificar las colonias de transformantes que contenían el inserto. Para realizar el screening se preparó un mix de reacción detallado de la siguiente manera:

Mix PCR	
DNA	10 μl
Buffer 5X	5 μl
dNTPS	1 μl
Primer #(inserto) FW	1 μl
Primer DRV	1 μl
Taq	0.25 μl
H2O	21.75 μl
Totales	50 μl

El programa de PCR se estableció como sigue: treinta y cinco ciclos a 94 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos, 60 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos, 72 $^{\circ}$ durante 1 minuto; luego 72 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos (Figura 10).

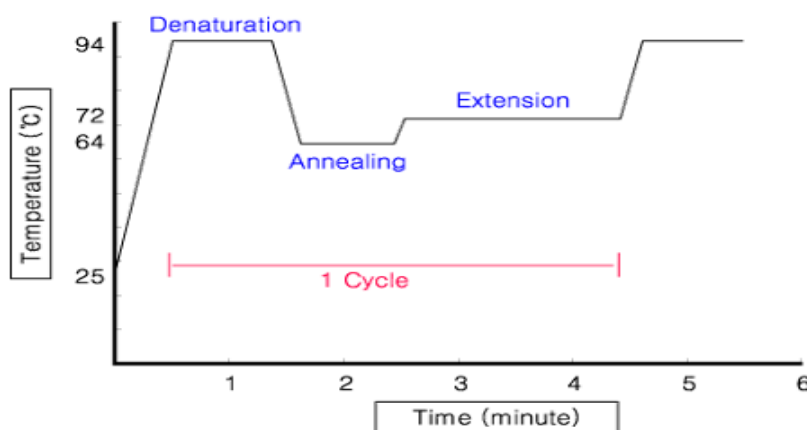


Figura 10 Gráfico de los ciclos de la PCR. Se detallan los diferentes ciclos que tienen lugar en la reacción a una temperatura y durante un tiempo determinado, en el que se suceden las fases de desnaturalización, renaturalización y extensión.

Una vez finalizada la reacción de PCR se carga la muestra en un gel de agarosa y se somete a electroforesis, como se ha descrito anteriormente.

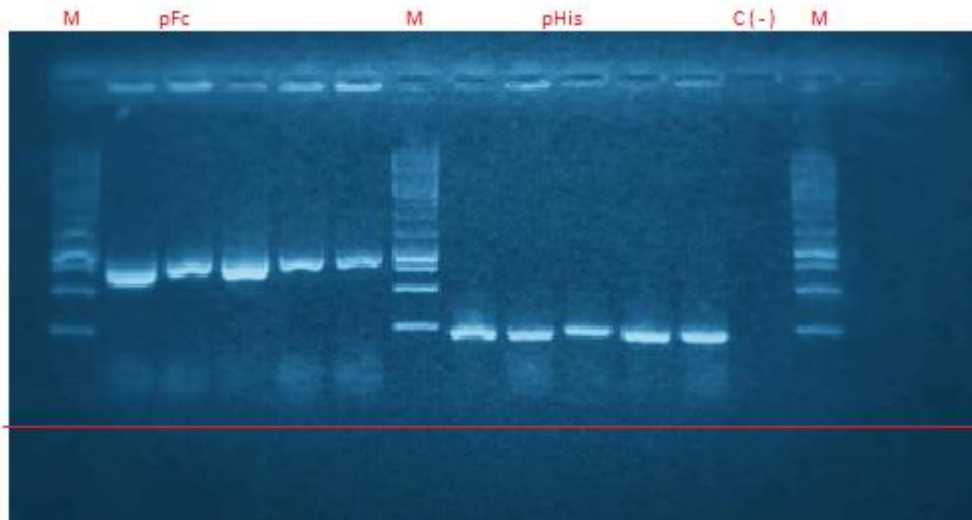


Figura 11 Electroforesis muestras inserto 7

Purificación, cuantificación y Stock de glicerol

Una vez comprobada la existencia de nuestro DNA de interés en las diferentes colonias mediante una PCR (Figura 11), se procede a crecer los cultivos para obtener una purificación del DNA.

Para el cultivo, se toma una muestra del cultivo bacteriano, que previamente se había depositado en una placa aparte, y se dejó crecer en 3 ml de medio LB, durante toda una noche a 37 °C. Tras el cultivo y previo a la miniprep, siempre se aseguró preparar un stock de glicerol de las colonias positivas para guardarlos a largo plazo, donde a 500 µL de cultivo bacteriano se le añadió 250 µL de glicerol al 50% en LB ampicilina y se guardó a -80 °C.

Minipreparación de DNA plasmídico (Miniprep)

Para la Miniprep se utilizó un protocolo de purificación con el kit GeneJET Plasmid Miniprep de la casa comercial Thermo Scientific, cuyo esquema se describe en la figura 12.

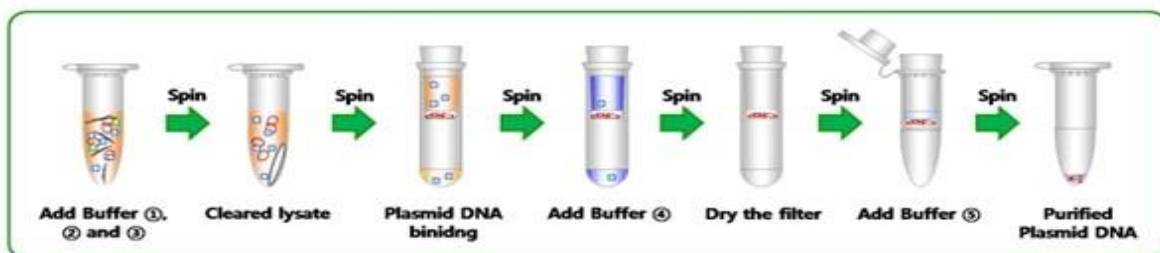


Figura 12 Esquema del protocolo de Miniprep.

Las concentraciones de DNA obtenidas en la miniprep fueron óptimas para llevar a cabo la secuenciación y la transformación de microalgas. Se muestra a continuación la relación de la concentración para los dos péptidos antimicrobianos elegidos. El inserto 6 se corresponde con la catelicidina procedente de *Alligator mississippiensis*; y el inserto 7 de la catelicidina procedente de *Chrysemys picta belli*.

CONCENTRACIÓN	PHIS	PFC
INSERTO 6	97'48 ng/ μ l	81'30 ng/ μ l
INSERTO 7	73'09 ng/ μ l	80'24 ng/ μ l

Seguidamente se procedió a enviar muestras del DNA plasmídico correspondiente a estos insertos ya clonados en los vectores pChlamy_4, para su secuenciación.

La secuenciación se realizó en un servicio de Secuenciación de Secugen, Madrid. Para ello, se prepararon 10 μ L de DNA plasmídico a una concentración aproximada de 200-300 ng/ μ L y se le añadió 0.5 μ L del primer correspondiente, a una concentración de 10 μ M. Tras agitar bien la mezcla, se etiquetaron los tubos y se enviaron al servicio.

Basándonos en los resultados de secuenciación, se comprobó que el clonaje de los péptidos había sido correcto, respecto a la secuencia diseñada bioinformáticamente y se conserva perfectamente el marco de lectura de las proteínas de fusión para la posterior transformación de microalgas (Figura 13).

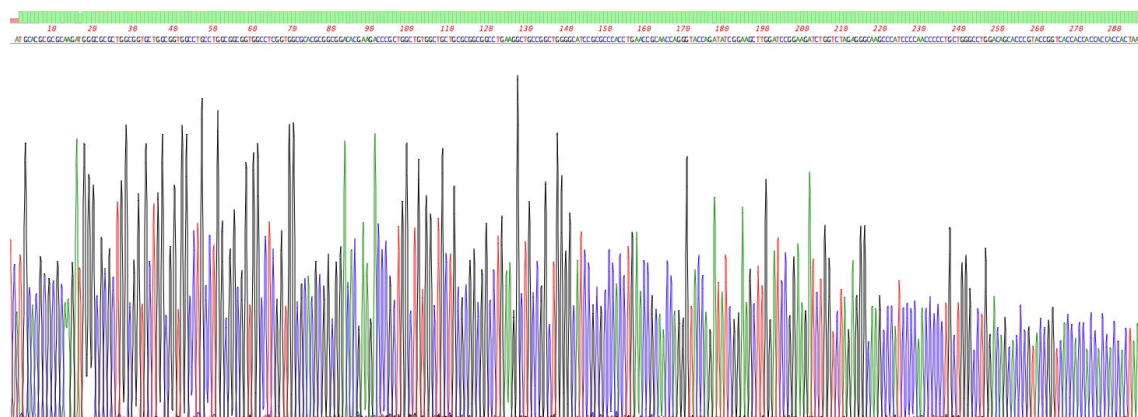


Figura 13 Imagen secuencia construcción 6 pHis

Digestión del DNA con Sca I

Una vez confirmado el éxito del clonaje mediante secuenciación, se preparó el plásmido para la transformación de microalgas. Para linearizar los vectores pFc y pHis, se sometió a digestión con la enzima Sca I añadiendo las siguientes cantidades:

Mix de Digestión	
DNA	22 μ l
Buffer	3 μ l
ScaI	5 μ l
Total 30 μ l	

La mezcla de reacción fue incubada durante 30 minutos a 37 °C en un termociclador, seguido de un paso de inactivación de la enzima mediante incubación de 5 minutos a 80 °C. Posteriormente, para eliminar la enzima de restricción y poder usar los vectores linearizados, se usó un kit comercial, MicroElute DNA Clean Up Kit (Life Technologies) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Transformación de Chlamydomonas

Se empleó la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, cuyo genoma es conocido y en el mercado existen numerosas técnicas y reactivos que permiten y facilitan su transformación nuclear para la producción de proteínas recombinantes. (Figura 14). También se ha comprobado que *C. reinhardtii* es capaz de producir inmunoglobulinas humanas [11,12].

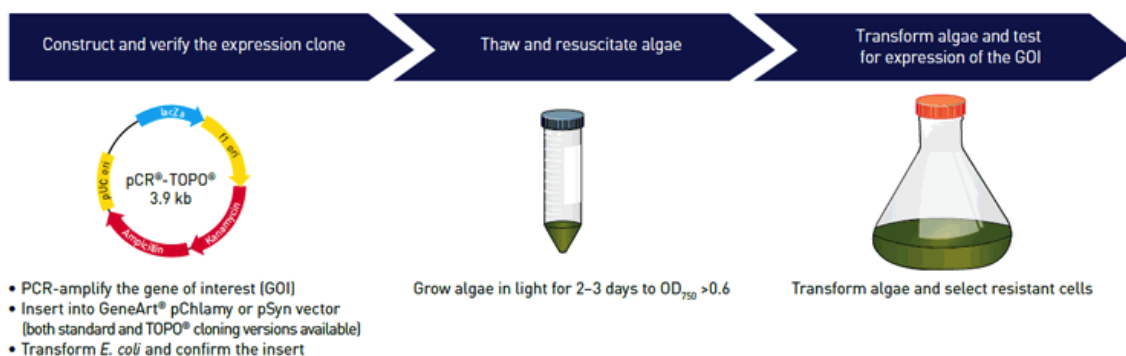


Figura 14 Esquema de transformación de *C. reinhardtii*.

Una vez linearizado el DNA y eliminado las enzimas de restricción, mediante la técnica de purificación con el kit MicroElute, se transformaron *Chlamydomonas* cepa c137 y c3395 para

introducir el vector pHis y pFc con los insertos de interés. El método de transformación utilizado es la electroporación con el Gene Pulser II de Bio-Rad.

PROTOCOLO DE ELECTROPORACIÓN

Cuando la concentración celular alcanzó un valor de $1 \times 10^6 - 2 \times 10^6$ células/mL, se cosecharon las microalgas mediante centrifugación a 2500 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y con cuidado se eliminó todo el mayor líquido posible.

Nota: Las células deben estar en fase logarítmica temprana y ser cosechadas cuidadosamente. Si la concentración celular es menor que 1×10^6 células/mL, todavía se pueden cosechar las células sin afectar significativamente la eficiencia de la transformación. Si la concentración celular excede a 3×10^6 células/mL, se debe descartar las células y comenzar de nuevo el cultivo.

Se resuspendió el pellet de células en 10 mL de Reactivo de Transformación GeneART MAX Efficiency® y se centrifugó a 2500 rpm durante cinco minutos. Se descartó el sobrenadante y con cuidado se elimina todo el líquido posible.

Se resuspendió el pellet de células de nuevo en 10 mL de Reactivo de Transformación GeneArt MAX Efficiency, y se centrifugó las células una vez más a 2500 rpm durante cinco minutos

Se resuspendió el pellet de células en Reactivo de Transformación GeneArt MAX Efficiency® a una concentración final de $2 \times 10^8 - 3 \times 10^8$ células/mL.

Se añadieron 2-4 µg de DNA linealizado por 250 µl de suspensión celular e incubar entre 2°C-8°C durante cinco minutos.

El conjunto de parámetros de electroporación en el Gene Pulser II® es el siguiente:

Cepa	Voltaje	Capacidad	Resistencia
C 137	500 V	50 McF	800 Ω
CC 3395	500 V	25 McF	200 Ω

Se transfirieron 250 µl de ADN celular mezclado en una cubeta de hielo (pre-refrigerada en hielo) justo antes de la electroporación.

Se electroporó las células usando los ajustes apropiados. Normalmente, el pulso electrónico dura alrededor de 30 milisegundos.

Después de la electroporación, se permitió que las células se recuperaran en la plataforma durante 15 minutos.

Se transfirieron las células a tubos cónicos o falcon de 50 mL, con 10 mL de solución TAP Sacarosa 40 mM a temperatura ambiente.

Se colocaron las células en el fitotrom (cámara de incubación de algas) a 26°C con agitación constante e incubar durante 14-16 horas.

Se cosecharon las células mediante centrifugación a 2500 rpm durante cinco minutos, descartar el sobrenadante, y se resuspendió el pellet en 200 µl de medio TAP a temperatura ambiente.

Se plaqueó toda la solución celular de cada transformación en placas con TAP-agar-Zeocina. Asegurando que las placas no tienen condensación.

Se colocó las placas de agar en el fitotrom a 26°C con agitación constante. Evitando apilar las placas para asegurar una continua y permanente iluminación.

Se incubaron las placas durante 5-7 días o hasta que las colonias de *Chlamydomonas reinhardtii* sean visibles claramente. El control del vector debe producir un mínimo de 30 transformantes por reacción de electroporación. La eficiencia de la electroporación con la construcción pChlamy_4 dependerá de la naturaleza, el tamaño y el contenido en codones del gen de interés, y el estado fisiológico de las células.

Se procedió a la determinación de la integración mediante PCR de las colonias antes de seleccionar clones para su posterior escalado.

Sobre el 50% de las colonias deben ser positivas para el gen de interés. Debido a la integración aleatoria y los eventos de silenciamiento en *C. reinhardtii*, se recomienda hacer la recolección de 10 colonias positivas y testarlas para el nivel de expresión del gen de interés por RT-PCR.

Una vez linearizado el vector con la enzima ScaI, se procedió a la transformación de microalgas. Sin embargo observamos que a los pocos días de la transformación e incubación en medio selectivo (TAP con zeocina), el cultivo de microalgas fue contaminado, (posiblemente con hongos) y se debe repetir la transformación (se está pendiente de concluir para este trabajo).

Discusión

El principal problema para la implementación y comercialización de los péptidos antimicrobianos reside en los elevados costes de producción mediante los métodos de síntesis convencionales y en su baja estabilidad. La expresión directa de los péptidos antimicrobianos en microorganismos procariotas es normalmente más difícil debido a la propia toxicidad de los péptidos hacia las bacterias recombinantes. Las microalgas ofrecen numerosas ventajas para la producción de AMPs, al tratarse de un sistema sostenible y económico que permite una elevada acumulación de proteínas heterólogas en tejido y compartimentos celulares específicos, con una fácil recuperación del producto de interés [5]. Asimismo, este sistema presenta la capacidad de modificaciones post-traduccionales para el correcto procesado de los péptidos. Comparado con los sistemas de expresión en plantas o en otros sistemas, las microalgas poseen un gran número de ventajas (tabla 3). Por ejemplo, es posible crecerlas en bioreactores cerrados, con lo que se reduce el riesgo de contaminación del sistema de producción por contaminantes del aire y también se protege el entorno del posible flujo de transgenes a los ecosistemas de los alrededores. El crecimiento en contenedores también protege al cultivo de pérdidas por el ataque de patógenos. Dado que las microalgas son microorganismos unicelulares, también debe haber menor variabilidad en los niveles de acumulación de proteínas recombinantes, que si usáramos plantas, por ejemplo, con lo que se consigue que el proceso de purificación sea más uniforme [6,7].

La expresión de proteínas heterólogas en *Chlamydomonas reinhardtii*, presenta algunas dificultades. El primer problema lo presenta el inusual número de codones parciales de genes nucleares de *C. reinhardtii* que tiene un alto contenido en G-C (62%), así que la optimización del codón debe ser preformada con otro gen el cual tenga un alto nivel de expresión de proteínas diseñadas[13,14]. Además, los niveles de expresión optimizados para genes foráneos puede variar considerablemente según el efecto de posición que es conducido por integración aleatoria del gen de interés y la fuerza del mecanismo de silenciamiento que es conducido por fenómenos similares a la epigenética, de las plantas terrestres[15]. En *C.reinhardtii* y otras algas, como en las plantas terrestres, transgenes de varias copias silenciados exhiben altos niveles de metilación de ADN [16]. Por otra parte, los genes de copia única están sujetos al silenciamiento génico sin detectar metilación de la citosina [17]. Otras características de la mayoría de los genes nucleares de *C. reinhardtii* es la presencia de

varios intrones pequeños en sus secuencias de codificación que ejerce un rol positivo en la expresión génica.

Features	Bacteria	Yeast	Mammalian cell culture	Transgenic animals	Transgenic plants	Transgenic microalgae
Production time	Short	Medium	Long	Long	Long	Short
Production cost	Medium	Medium	High	High	Low	Very low
Scale up cost	High ^a	High ^a	High ^a	High ^a	Low	Very low
Cost/storage	Cheap/-20 ^o c	Cheap/-20 ^o c	Expensive LN	Expensive LN	Cheap RT	Cheap RT
Production scale	Limited	Limited	Limited	Limited	Worldwide	Worldwide
Propagation	Easy	Easy	Hard	Feasible	Easy	Very easy
Distribution	Feasible	Feasible	Difficult	Difficult	Easy	Easy
Delivery vehicle	No	No	No	Yes	Possible	Possible
Gene size	Unknown	Unknown	Limited	Limited	Not limited	Not limited
Glycosylation	Absent	Incorrect	'Correct'	'Correct'	'Correct'	'Correct'
Multimeric protein assembly	No	No	No	Yes	Yes	Yes
Protein yield	Medium	High	Medium-high	High	High	^b
Risk ^c	Yes	Unknown	Yes	Yes	Unknown	Unknown
Safety	Low	^b	Medium	High	High	High
Ethical concerns	Low	Medium	Medium	High	Medium	Medium

Tabla 3 Comparativa entre los diferentes organismos como productores de péptidos antimicrobianos sintéticos.

Conclusiones

A partir de un vector comercial, se han obtenido dos vectores de expresión para microalgas capaces de generar dos tipos de proteínas de fusión: una con colas de histidina y otra que genera una inmuno adhesina.

Usando estos dos vectores, y mediante herramientas de ingeniería genética, se han introducido dos secuencias de ADN sintético que codifican dos péptidos antimicrobianos y se ha verificado su correcto posicionamiento mediante secuenciación.

Con dichas construcciones se han iniciado los experimentos para la transformación de microalgas, que están pendientes de finalizar una vez resolvamos los problemas con el cultivo de las microalgas post-transformación.

Conclusions

From a commercial vector, have been obtained two expression vectors microalgae capable of generating two types of fusion proteins: A histidine-tagged and one that generates an immunoadhesin.

Using these two vectors, and by genetic engineering tools have been introduced two synthetic DNA sequences encoding two antimicrobial peptides.

With such constructions we have initiated experiments to transform algae, which are still to be finalized, once we solve the problems with the cultivation of post-transforming microalgae.

Referencias bibliográficas

1. Malnoy, M., et al., *Fire blight: applied genomic insights of the pathogen and host*. Annu Rev Phytopathol, 2012. **50**: p. 475-94.
2. Berger, S., A.K. Sinha, and T. Roitsch, *Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions*. J Exp Bot, 2007. **58**(15-16): p. 4019-26.
3. Escobar, M.A. and A.M. Dandekar, *Agrobacterium tumefaciens as an agent of disease*. Trends Plant Sci, 2003. **8**(8): p. 380-6.
4. Rahnamaeian, M., *Antimicrobial peptides: modes of mechanism, modulation of defense responses*. Plant Signal Behav, 2011. **6**(9): p. 1325-32.
5. Gong, Y., et al., *Microalgae as platforms for production of recombinant proteins and valuable compounds: progress and prospects*. J Ind Microbiol Biotechnol, 2011. **38**(12): p. 1879-90.
6. Rochaix, J.D., *Chlamydomonas reinhardtii as the photosynthetic yeast*. Annu Rev Genet, 1995. **29**: p. 209-30.
7. Specht, E., S. Miyake-Stoner, and S. Mayfield, *Micro-algae come of age as a platform for recombinant protein production*. Biotechnol Lett, 2010. **32**(10): p. 1373-83.
8. Griesbeck, C., I. Kobl, and M. Heitzer, *Chlamydomonas reinhardtii: a protein expression system for pharmaceutical and biotechnological proteins*. Mol Biotechnol, 2006. **34**(2): p. 213-23.
9. Rosales-Mendoza, S., L.M. Paz-Maldonado, and R.E. Soria-Guerra, *Chlamydomonas reinhardtii as a viable platform for the production of recombinant proteins: current status and perspectives*. Plant Cell Rep, 2012. **31**(3): p. 479-94.
10. Pérez-de-la-Lastra, J., L. Kremer, and J. de-la-Fuente, *Recent Advances in the Development of Immunoadhesins for Immune Therapy and as Anti-Infective Agents*. Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery, 2009. **4**(3): p. 183-189.
11. Mayfield, S.P. and S.E. Franklin, *Expression of human antibodies in eukaryotic micro-algae*. Vaccine, 2005. **23**(15): p. 1828-32.
12. Franklin, S.E. and S.P. Mayfield, *Recent developments in the production of human therapeutic proteins in eukaryotic algae*. Expert Opin Biol Ther, 2005. **5**(2): p. 225-35.
13. Fuhrmann et al., 2004; Furhman et al., 1999.
14. Heitzer et al., 2007.
15. Schroda, 2006.
16. Babinger et al., 2001.
17. Cerutti et al., 1997.
18. *Beta-Lactamase Repressor BlaI Modulates Staphylococcus aureus Cathelicidin Antimicrobial Peptide Resistance and Virulence*. Pence MA, Haste NM, Meharena HS, Olson J, Gallo RL, Nizet V, Kristian SA. PLoS One. 2015 Aug 25;10(8):e0136605
19. Pérez de la Lastra et al.