

ULL

Universidad  
de La Laguna



Biología de  
macromoléculas



Molecular cloning of antimicrobial peptides

Clonaje molecular de péptidos  
antimicrobianos

**Trabajo Fin de Grado**

Elisa González Guerra

Julio, 2016

<b>SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN</b> <b>TRABAJO FIN DE GRADO</b> <b>Curso Académico: 2015/2016</b>	<b>ENTRADA</b>  Fecha: 4/07/2016 Núm:
--	--

**Datos Personales**

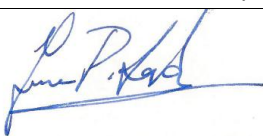
Nº DNI o pasaporte:	Nombre y Apellidos:
54113011-Z	Elisa González Guerra
Teléfono:	Dirección de correo electrónico:
664244183	elisagonzalez90@hotmail.com

**SOLICITA** la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

**TÍTULO**

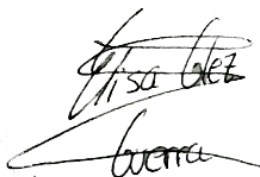
Clonaje molecular de péptidos antimicrobianos
---

**Autorización para su depósito, defensa y evaluación**

<b>D.. José Manuel Pérez de la Lastra Pérez de la Lastra</b>	
<b>Científico Titular del CSIC, en el Instituto de Productos Naturales y Agrobiología (Grupo de Biotecnología de Macromoléculas)</b>	
<b>y D. Ricardo Guillermo Álvarez</b>	
<b>Profesor/a del Departamento de Química Orgánica de la ULL</b>	
autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado	
 Fdo de la Lastra	Fdo.: Ricardo Guillermo Álvarez

La Laguna, a \_\_4\_\_ de \_\_\_\_ Julio \_\_\_\_ de 2016

**Firma del interesado/a**



**SR/A. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE GRADO DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA**

## **Índice**

Abstract .....	6
Resumen .....	6
Introducción .....	7
Objetivos .....	12
Material y métodos .....	13
Resultados .....	17
Discusión .....	27
Conclusiones .....	28
Conclusions .....	29
Bibliografía.....	30

## **Agradecimientos**

En primer lugar, agradecer a mi tutor, Ricardo Guillermo Álvarez, toda la ayuda, el apoyo y la orientación recibida a lo largo de todo el trabajo.

Agradecer también a mi tutor de trabajo experimental, José Manuel Pérez de la Lastra, por todas sus enseñanzas, apoyo continuo y todo el tiempo dedicado para que este trabajo saliera adelante.

Gracias a mis compañeras de laboratorio, Cristina Garrido y Lidia Borges, por compartir sus conocimientos, por su ayuda y por todos los ánimos.

## **Lista de abreviaturas**

AMPs (Antimicrobial Peptides = Péptidos Antimicrobianos)

*S. elongatus* (*Synechococcus elongatus*)

*E. coli* (*Escherichia coli*)

FDA (Food and Drug Administration)

TFG (Trabajo Fin de Grado)

## **Abstract**

Due to the actual resistance from the microorganisms to the conventional antibiotics has led to the searching for antimicrobial alternatives. The antimicrobial peptides (AMPs) are a good alternative because of its relative nonspecific regarding its action mechanism, due to the fact that it is difficult for the microorganisms to develop resistant strain.

Once we have identified the coding sequence of these peptides, it is carried out synthetic biology and recombinant DNA techniques in order to change and introduce them into the unicellular cyanobacteria's genome *Synechococcus elongatus*. This is a good example of expression because of its little genome, that facilitates its genetically change, its low production cost, its easy crop and they are harmless to the human being.

In this study, from one commercial vector and through genetic engineering tools, it has been possible to introduce one synthetic DNA sequence that codify to an antimicrobial peptide. The results obtained have proven that the peptide's cloning has been correct and that it is prepared to integrate it into the *Synechococcus elongatus* genome.

**Keywords:** Antimicrobial peptides, peptides, *Synechococcus elongatus*, biotechnology, genetic engineering.

## **Resumen**

La situación actual de resistencia de los microorganismos a los antibióticos convencionales ha llevado a la búsqueda de alternativas antimicrobianas. Los péptidos antimicrobianos resultan una buena alternativa debido a su relativa inespecificidad en cuanto a su mecanismo de acción, debido a que a los microorganismos no les resulta sencillo desarrollar cepas resistentes, ya que para ello sería necesario cambios en la composición lipídica de sus membranas.

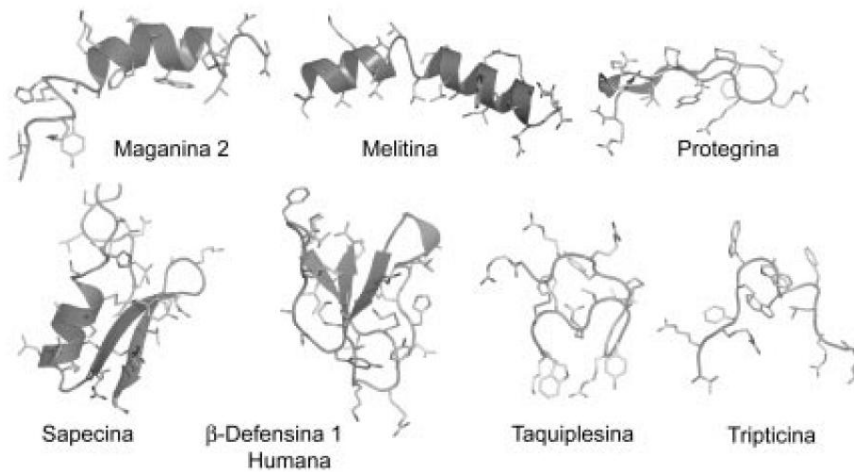
Una vez identificada la secuencia codificante de estos péptidos, se llevan a cabo técnicas de biología sintética y de ADN recombinante para modificarlos e introducirlos en el genoma de la cianobacteria unicelular *Synechococcus elongatus*. Ésta resulta ser un excelente modelo de expresión debido a su pequeño genoma, que facilita el que pueda ser manipulada genéticamente, a su bajo coste de producción, su fácil cultivo y que generalmente son consideradas inocuas para el ser humano.

En este estudio, a partir de un vector comercial y mediante herramientas de ingeniería genética, se ha logrado introducir una secuencia de ADN sintético que codifica para un péptido antimicrobiano. Los resultados obtenidos han mostrado que el clonaje del péptido ha sido efectivo y que está preparado para integrarse correctamente en el genoma de *Synechococcus elongatus*.

## **Introducción**

En la actualidad, el uso indiscriminado de antibióticos para el control de infecciones ha desencadenado la aparición de cepas resistentes de patógenos causantes de enfermedades. Por otro lado, en la agricultura, el uso de agroquímicos también ha desarrollado una resistencia por parte de microorganismos fitopatógenos. Esta problemática situación de resistencia ha dado lugar a que, en los últimos años, se hayan incrementado los estudios sobre la aplicación de los péptidos antimicrobianos (AMPs), también llamados péptidos de defensa del hospedador (host-defense peptides, HDP), como alternativa a los antibióticos convencionales. La enorme ventaja de los AMPs es que, debido a su relativa inespecificidad en cuanto a su mecanismo de acción, a los microorganismos no les resulta sencillo desarrollar cepas resistentes, ya que para ello sería necesario enormes cambios en la composición lipídica de sus membranas celulares (donde se produce la interacción de los AMPs).

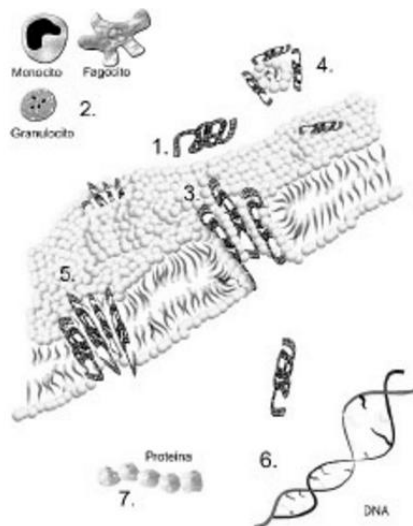
Los AMPs son una familia de sustancias que se caracterizan por presentar un alto potencial de uso clínico, debido principalmente a sus múltiples mecanismos de acción, un amplio espectro de actividad (antiviral, antifúngica, antibacteriana e, incluso, antitumoral), un bajo potencial de resistencia, baja toxicidad y estabilidad frente a proteasas. Se encuentran en una amplia variedad de organismos, desde procariotas a eucariotas como mamíferos, anfibios, insectos y plantas, y son considerados componentes evolutivamente conservados de su respuesta inmune innata. Pero su gran diversidad no sólo se debe a que se han encontrado en todos los animales, sino también a su variada estructura química y composición. Generalmente, contienen alrededor de 30-80 aminoácidos y son producidos de forma constitutiva o inducible, dependiendo del organismo y del tejido en el que estén presentes, por diferentes tipos de células. Además, son péptidos de bajo peso molecular, normalmente de alrededor de 10 KDa, y son codificados en el genoma, a diferencia de los antimicrobianos producidos mediante acción enzimática, como es el caso de la penicilina. Evolutivamente, estos péptidos se han desarrollado por procesos de duplicación, divergencia y presión selectiva, dada la interacción de cada especie con su ambiente y patógenos específicos.



**Figura 1. Diversidad estructural de péptidos antimicrobianos.**

Generalmente, se tratan de moléculas catiónicas, es decir, poseen carga neta positiva, lo cual es debido a que presentan un alto contenido en aminoácidos como arginina, lisina o histidina. Esto permite su interacción con los fosfolípidos aniónicos de las membranas bacterianas y otros patógenos. Además, estructuralmente son moléculas anfipáticas, característica que les confiere una gran estabilidad tanto en ambientes hidrofílicos como hidrofóbicos. La diferencia entre las regiones polares y no polares es de enorme importancia para la actividad y la citotoxicidad de los AMPs. El mecanismo de acción de estos péptidos es muy distinto al de los antibióticos convencionales. Su actividad está dirigida principalmente a las membranas celulares, produciendo su desestabilización. Los AMPs presentan una amplia diversidad en lo que se refiere a su actividad biológica, siendo activos frente a una amplia variedad de patógenos, incluyendo a bacterias, virus, hongos y protozoos.





**Figura 2. Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos. (1) Interacción con la membrana. (2) Funciones inmunomoduladoras. (3) Formación de poro en forma anular. (4) Mecanismo de agregado. (5) Forma de poro en forma de barril. (6) Interacción con el ADN y proteínas relacionadas. (7) Mecanismos que alteran la síntesis y plegamiento de proteínas.**

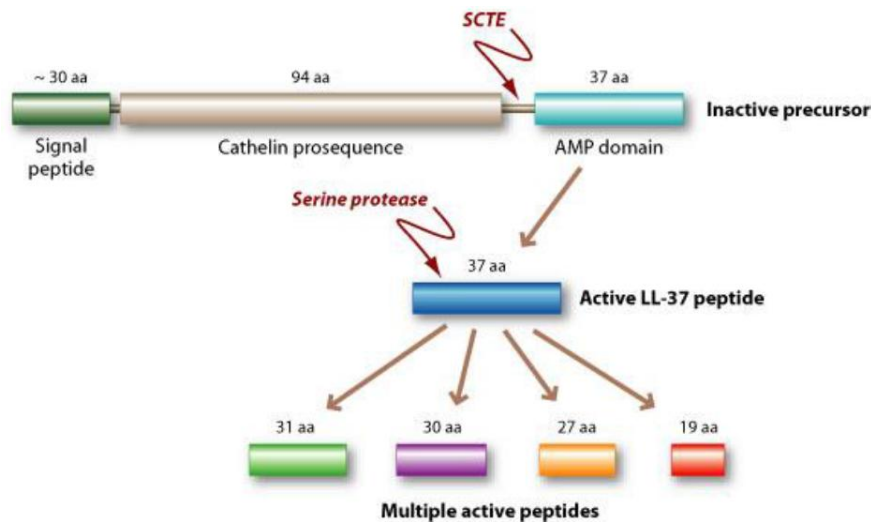
La creciente aparición de cepas patógenas resistentes a los antibióticos ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas antimicrobianas. Los péptidos antimicrobianos, los cuales se han encontrado en casi todos los seres vivos, cubren muchos de los requerimientos que demandan las industrias farmacéuticas, la agricultura e, incluso, la producción de alimentos. La variedad de propiedades físicas y el éxito evolutivo de estos péptidos hacen de ellos sustancias ideales para el desarrollo de futuras aplicaciones terapéuticas. Sin embargo, actualmente no existe ningún péptido aprobado para uso en humanos por la Food and Drug Administration (FDA).

El presente estudio se ha llevado a cabo 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. Se usaron herramientas bioinformáticas para rastrear genomas de especies que se encuentran constantemente expuestas al ambiente, y se han identificado péptidos antimicrobianos potenciales. Recientemente, el equipo investigador del grupo de Biotecnología de Macromoléculas (IPNA) ha descubierto una serie de péptidos antimicrobianos con origen en distintos organismos como mamíferos, tanto terrestres como marinos y voladores, reptiles y aves (Tabla 1).

**Tabla 1. Relación de péptidos antimicrobianos identificados en mamíferos, aves y reptiles.**

Péptido	Especie	Carga neta	Hidrof	Índice Boman (kcal/mol)	Estructura
Tt_FR-28	Delfín ( <i>Tursiops truncatus</i> )	+7	25%	2.67	P-rich
Am_TR-26	Caimán ( <i>Alligator mississippiensis</i> )	+5	46%	1.75	$\alpha$ -helix
Cp_SP-37	Tortuga pintada ( <i>Chrysemys pictabellii</i> )	+9	24%	2.59	$\alpha$ -helix
Cp_RR-33	Tortuga pintada ( <i>Chrysemys pictabellii</i> )	+13	33%	3.9	$\alpha$ -helix
M1_LN-35	Murciélago ( <i>Myotis lucifugus</i> )	+8	40%	1.33	$\alpha$ -helix
M1_RF-32	Murciélago ( <i>Myotis lucifugus</i> )	+4	31%	2.38	$\alpha$ -helix
Cc_PT-33	Topo de nariz estrellada ( <i>Condylura cristata</i> )	+2	24%	2.34	$\alpha$ -helix
Cc_KL-41	Topo de nariz estrellada ( <i>Condylura cristata</i> )	+6	31%	2.42	$\alpha$ -helix
Tm_KR-41	Manatí ( <i>Tritichechus manatus latirostris</i> )	+7	26%	2.92	$\alpha$ -helix
Od_QR-42	Degú ( <i>Octodon degus</i> )	+11	28%	3.05	$\alpha$ -helix
Vp_GF-35	Alpaca ( <i>Vicugna pacos</i> )	+3	37%	1.88	$\alpha$ -helix
Pv_KS-16	Zorro volador ( <i>Pteropus vampyrus</i> )	+2	43%	2.26	$\alpha$ -helix
Et_KR-42	Erizo ( <i>Echinops telfairi</i> )	+4	30%	3.17	$\alpha$ -helix
Ef_KF-43	Murciélago ( <i>Eptesicus fuscus</i> )	+7	30%	3.46	$\alpha$ -helix
Mp_SK-38	Hurón ( <i>Mustela putoris furo</i> )	+8	26%	3.64	$\alpha$ -helix
Ca_KR-38	Topo dorado del Cabo ( <i>Chrysochloris asiatica</i> )	+8	31%	2.99	$\alpha$ -helix
Mm_LV-34	Periquito ( <i>Melopsittacus mudulatus</i> )	+10	38%	3.16	$\alpha$ -helix
Mm_KR-26	Periquito ( <i>Melopsittacus mudulatus</i> )	+5	50%	0.65	$\alpha$ -helix

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 pre-pro-péptidos (Figura 3), cuyo procesamiento consiste en la eliminación proteolítica del propéptido tras la degranulación de neutrófilos.



**Figura 3. Ejemplo de catelicidina.**

Todas las catelicidinas incluyen en sus extremos N-terminal péptidos señal seguidos de un dominio similar a catelina (la pro-región), muy conservado entre especies, seguido por un dominio antimicrobiano en su extremo C-terminal, muy diverso, y que carece de secuencias conservadas o consenso. El dominio C-terminal es el que representa el péptido activo biológico. Los genes que codifican las catelicidinas de vertebrados son alrededor de 2 kb de tamaño y todos contienen cuatro exones. Hasta la fecha, los genes de catelicidinas sólo se han observado en los vertebrados. En humanos y en los vertebrados superiores, el exón 4 siempre codifica para el péptido de catelicidina activo. Las regiones promotoras de los genes de catelicidina contienen sitios de reconocimiento que también se encuentran en las regiones promotoras de los genes que participan en la respuesta inmune. La mayoría de catelicidinas se almacenan en forma de pro-péptido inactivo, dentro de la gránulos de las células inmunes circulantes. Sin embargo, también se expresan en diversos células no mieloides, particularmente en sitios tales como la superficie de la piel y de las mucosas externas.

El número de catelicidinas es diferente entre las especies. Por ejemplo, las vacas tienen once genes, las ovejas tienen ocho, y en humanos sólo se conoce un gen. Éste último se encuentra en el cromosoma 3 y es llamado CAMP. Codifica para una sola pre-proteína, denominada precursor de catelicidina (hCAP18), el cual fue aislado en un principio en células de médula ósea y en queratinocitos en lugares de inflamación.

En los mamíferos, la estructura de las catelicidinas son muy diversas, van desde las horquillas de cisteína con puentes disulfuro, a moléculas lineales de péptidos ricos en prolina y/o triptófano, o dispuestos en alfa-hélices. Los tamaños de los péptidos maduros oscilan entre 15

a más de 80 residuos. La estructura alfa-helicoidal es la más extendida, y sus miembros generalmente muestra un amplio espectro de actividad bactericida. Esta diversidad estructural dentro de la familia de catelicidina podría reflejar el espectro microbicida y actividades inmunomoduladoras de catelicidinas en diferentes especies expuestas diferente carga microbiana.

Una vez que se han identificado la secuencia de los péptidos se llevan a cabo técnicas de biología sintética y de ADN recombinante para poder modificarlos e introducirlos en *Synechococcus elongatus*. Esta cianobacteria unicelular es un excelente modelo de expresión debido a, por un lado, su pequeño genoma, que facilita el que pueda ser fácilmente manipulada genéticamente y, por otro, su bajo coste de producción y su fácil cultivo.

## **Objetivos**

Los AMPs desarrollados en el IPNA, a partir de una amplia variedad de animales (tanto mamíferos, como aves y reptiles) son totalmente novedosos y de gran potencial como agentes antimicrobianos. Para el presente estudio se tomó como referencia la catelicidina procedente de la especie *Trichechus manatus latirostris* (manatí).

Para el presente estudio se plantearon una serie de objetivos:

1. Amplificación mediante PCR de ADN sintético codificante para péptidos antimicrobiano con objeto de introducir dianas para enzimas de restricción.
2. Purificación del ADN amplificado.
3. Digestión del ADN amplificado y de un vector de expresión adecuado para cianobacterias .
4. Ligación del ADN en el vector de expresión y transformación de *E.coli*.
5. Selección de las bacteria *E. coli* recombinantes
6. Cultivar las colonias seleccionadas y purificar su DNA plasmídico.
7. Secuenciación del DNA plasmídico para verificar su correcto clonaje.
8. Transformación de microalgas con las construcciones sintéticas.

## **Material y métodos**

### **Microorganismos**

Los microorganismos empleados en este estudio fueron células competentes de *Escherichia coli* cepa One Shot® TOP10 y la cianobacteria *Synechococcus elongatus* cepa PCC 7942, ambas de Life Sciences.

Las células competentes de *E. coli* se almacenaban en criopreservación a -80°C, y se cultivaban en medio LB (Luria-Bernati).

*S. elongatus* también se conservaban en criopreservación, y requirió de un paso previo de descongelación. Fueron cultivadas en medio Gibco® BG-11 e incubadas en una cámara de cultivo SANYO environmental test chamber modelo MLR 352 H a 34°C, una humedad del 43% y una iluminación de 3 LS. La incubación se realizó en agitación suave a 100-200 r.p.m.

### **Péptidos antimicrobianos**

En el presente trabajo se utilizó la catelicidina procedente de *Tritrichostichus manatus latirostris* (manatí).

Tm\_KR-41: KRSGNLGRLLIRKGGGEKIGKKIERVGQRIKEFFEKLAPTTES

### **Estudio *in silico* de propiedades relacionadas con la actividad antimicrobiana**

La posible actividad antimicrobiana de este péptido fue evaluada *in silico* con la herramienta AMPA (<http://tcoffee.crg.cat/apps/ampa/do>) y la herramienta APD3 ([http://aps.unmc.edu/AP/prediction/prediction\\_main.php](http://aps.unmc.edu/AP/prediction/prediction_main.php)), ambas con parámetros definidos por defecto.

El porcentaje de hidrofobicidad y el índice de Boman fue calculado por ADP3. El índice de Boman estima el potencial que tiene una proteína de unirse a otra proteína. Por ejemplo, si un péptido tiene un alto índice de Boman quiere decir que dicho péptido sería multifuncional y, por ejemplo, una vez dentro de la célula, éste tendría más o menos capacidad para unirse a varias proteínas y realizar diferentes funciones dentro de la célula, dada su capacidad para interactuar con un amplio rango de proteínas.

La estructura secundaria del péptido se calculó con la herramienta PSIPred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). La alfa-helicidad de las regiones presentes en el péptido se visualizó en 2D mediante la herramienta de proyecciones helicoidales disponibles en el sitio web <http://rzlab.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi>.

## Material genético de partida

Para obtener las secuencias con la optimización de los codones para microalgas se empleó la plataforma DNA 2.0 (<http://www.dna20.com>), a partir de las secuencias de aminoácidos correspondientes.

El acceso a los genomas de las diferentes especies estudiadas se realizó a través de la bases de datos pública GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>). En las fechas en las que se realizó la búsqueda, diferentes genomas todavía se encontraban ensamblados en contiguos (contigs) o andamios (scaffolds), que eran accesibles para su rastreo mediante BLAST de nucleótido (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Para el rastreo de los genomas de animales se usó una secuencia de nucleótidos de 83 bp, basada en una región muy conservada entre las catelicidinas de aves, que se corresponde con la siguiente secuencia:

```
cccaggctgtggactcctacaaccaacggcctgaggtgcagaatgccttccggctgctca
P R L W T P T T N G L R C R M P S G C S
gcgccgacccccgagccccggccccg
A P T P S P A
```

La búsqueda de secuencias homólogas a esta secuencia se realizó mediante la aplicación BLAST, usando los valores de los parámetros por defecto, la cual devolvía los contiguos (contigs) o andamios (scaffolds) de ADN genómico donde podrían encontrarse secuencias homólogas a la secuencia y, por tanto, probables genes codificantes de catelicidinas.

## Predicción de genes de catelicidinas

Una vez obtenidos los diferentes contigs de homología con esta secuencia se procedió a estudiar si éstos contenían genes correspondientes a catelicidinas. Para ello, se usaron dos tipos de softwares: GeneScan (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) y GeneMark (<http://exon.gatech.edu/GeneMark/>), con los valores por defecto de los diferentes parámetros. Ambos programas predicen genes putativos dentro de estos contigs o andamios de secuencias previamente seleccionadas. El criterio adoptado para la identificación de catelicidinas en dichos contigs fue que los genes predichos contuvieran cuatro exones y que, además, la secuencia de aminoácidos de los tres primeros exones fuese homóloga a las catelicidinas ya conocidas, con un porcentaje de identidad de residuos de más de un 30%, siempre que se conservara la posición de algunos residuos clave del pre-pro-péptido, como eran las cisteínas, esenciales para el mantenimiento de su estructura.

## **Predicción de péptidos antimicrobianos**

El cuarto exón de las catelicidinas predichas fue entonces traducido a aminoácidos y, para identificar el posible sitio de corte por la enzima elastasa de neutrófilos, la secuencia de aminoácidos del cuarto exón se sometió a la herramienta on line Peptidecutter ([http://web.expasy.org/peptide\\_cutter/](http://web.expasy.org/peptide_cutter/)), tomándose como péptido activo aquel generado tras el corte teórico por esta enzima en su posición más izquierda, hacia el extremo C-terminal.

## **Vector de partida**

El clonaje de péptidos antimicrobianos en *S. elongatus* se realizó partiendo del vector comercial pSyn\_6 procedente de la casa Invitrogen (<http://www.thermofisher.com>). Este plásmido cuenta con varias características que lo convierte en un sistema idóneo para facilitar el proceso de expresión de las secuencias de interés (Figura 4).

A continuación se enumeran las características del mismo:

**NS1 (sitio neutral 1)**, que se tratan de sitios de recombinación homóloga para la integración del vector en el genoma de *S. elongatus*.

**Promotor constitutivo fuerte del gen psbA** (que codifica para la proteína D1 del Fotosistema II) de *S. elongatus* PCC 7942, que conduce a un nivel de expresión alto del gen de interés.

**Tag de polihistidinas N-terminal** seguida de un **sitio de reconocimiento TEV** que permite a la proteasa dependiente de escisión de la cola de histidinas formar la proteína recombinante tras la purificación.

**V5 epítopos N-terminal**, seguido por una tag de polihistidinas, para la detección (mediante anticuerpos anti-V5) y purificación de la proteína recombinante.

**Dos sitios de clonaje múltiple** (MCS1: BglII, NdeI y MSC2: HindIII, BamHI, EcoRI, KpnI), los cuales proporcionan la opción de añadir tags de polihistidinas N-terminal y C-terminal a la proteína de fusión recombinante en cualquier combinación (una, ambas o ninguna).

**Gen de resistencia a la espectinomicina**, útil para la selección de los plásmidos en *E. coli* y *S. elongatus* PCC 7942.

**Origen pUC**, que permite la alta replicación de copia y el crecimiento en *E. coli*.

Sitio RP4/RK2 bom (base de movilidad o oriT), para la conjugación.

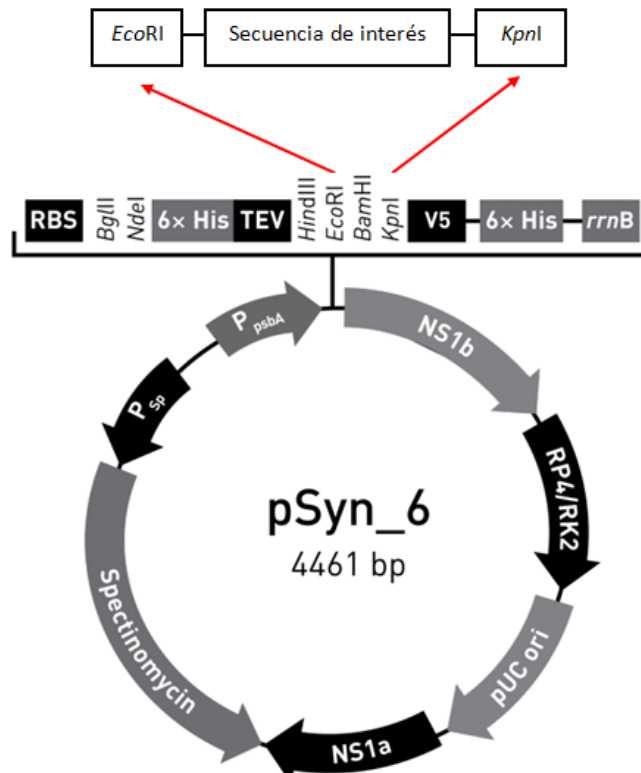


Figura 4. Esquema representativo del vector pSyn\_6 que muestra las enzimas empleadas para introducir las secuencias de interés, EcoRI y KpnI.

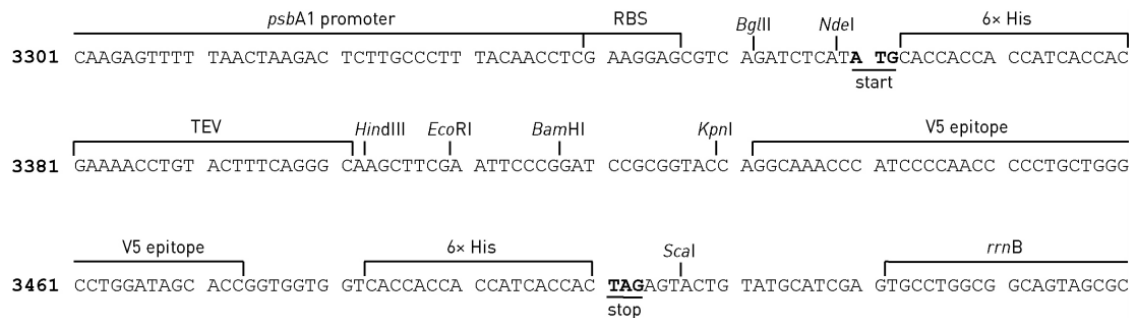


Figura 5. Los sitios de restricción están etiquetados para indicar los lugares de escisión, y los codones de inicio y parada se muestran en negrita. El vector pSyn\_6 contiene, además, un sitio de unión a ribosoma (RBS), GAAGGAG, para una eficiente iniciación de la traducción. Este diagrama se empleó para diseñar primers de PCR adecuados para el clonaje de los productos de PCR en el vector.

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



Las enzimas de restricción fueron de Fermentas (Thermofisher) y los marcadores de peso molecular de GeneRuler 1 Kb y 100 pb (Thermofisher). Los kits de biología molecular empleados en el presente estudio fueron: kit PureLink™ Quick PCR Purification (Thermofisher) para la purificación del ADN producto de PCR; GeneClean® (MP Biomedicals) para la purificación de ADN a partir de una banda aislada de un gel de agarosa; GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific) para la minipreparación de ADN plasmídico; y MicroElute DNA Clean Up Kit (Omega) para purificar el ADN tras la digestión enzimática.

La cuantificación del ADN se realizó en el espectrofotómetro Maestronano (MaestroGen), empleando 2 µl de muestra.

## Resultados

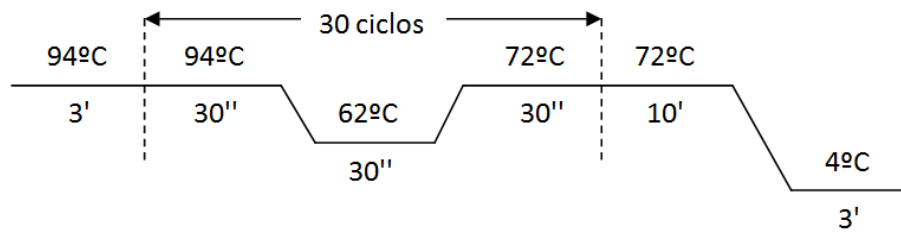
En este apartado se describen, junto con los resultados, las estrategias y los procedimientos llevados a cabo para el clonaje molecular del péptido antimicrobiano empleado en este estudio.

### PCR de los insertos

Primeramente, se llevó a cabo una PCR con el objetivo de amplificar para obtener un gran número de copias de los fragmentos de ADN correspondientes al inserto de interés. Este paso es necesario para poder realizar la posterior digestión. Se preparó una mix de reacción que se detalla a continuación:

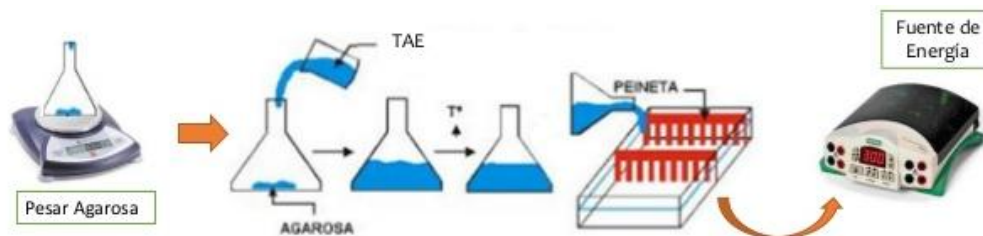
Mix de reacción
1 µl de ADN (inserto)
5 µl de buffer 10X
1 µl de dNTPs
1 µl de primer forward
1 µl primer Reverse
0.25 µl de taq polimerasa
40.75 µl de H <sub>2</sub> O
Volumen total de 50 µl

Se introdujo en el termociclador con las siguientes condiciones:



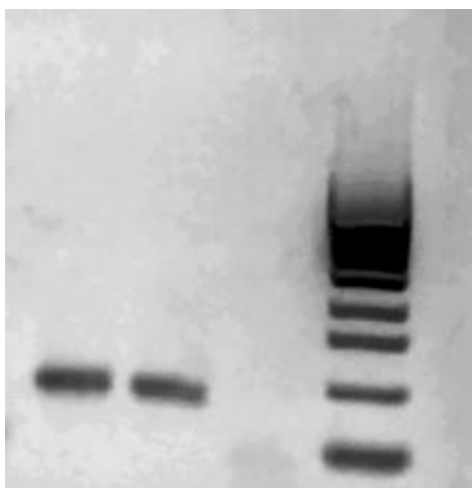
Los productos de la PCR posteriormente fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en tampón TAE (tris-acetato-EDTA), conteniendo 5 µl de Gelgreen a una dilución 1/10000 (v/v), que permite la visualización de las muestras y el análisis de los resultados.

Para la preparación del gel se emplean 3 gramos de agarosa, se enrasan con tampón TAE hasta alcanzar los 200 ml y se lleva a ebullición para disolver bien la agarosa. Se coloca el peine para formar los pocillos de carga, se añade la agarosa disuelta en el TAE y se deja solidificar, aproximadamente unos 10-15 minutos. Posteriormente, se retira el peine y se procede a cargar 10 µl de la muestra. Se emplea un cargador que le confiere densidad a la muestra para que se asiente en el fondo del pocillo y no se contamine el gel, además, facilita la visualización de la misma (Figura 6).



**Figura 6. Esquema que detalla la preparación de un gel de agarosa.**

Por último, se procede a correr la electroforesis, empleando un amperaje de 150 V durante 20 minutos. Una vez finalizada, se procede a visualizar las bandas del gel en un transiluminador de luz azul.



**Figura 7. Bandas que se corresponden al inserto #13, junto a su control negativo.**

La purificación del inserto se llevó a cabo con el kit PureLink™ Quick PCR Purification (Thermofisher). La cuantificación del ADN se realizó en un Maestronano, donde se colocan 2 µl de cada muestra. Obtuvimos el resultado de la concentración expresado en ng/µl (Tabla 2). Para ajustar el blanco se empleó el buffer de elución del mismo kit.

**Tabla 2. Concentración de ADN.**

<b>Inserto</b>	<b>Concentración ADN (ng/µl)</b>
<b>#13</b>	43.32

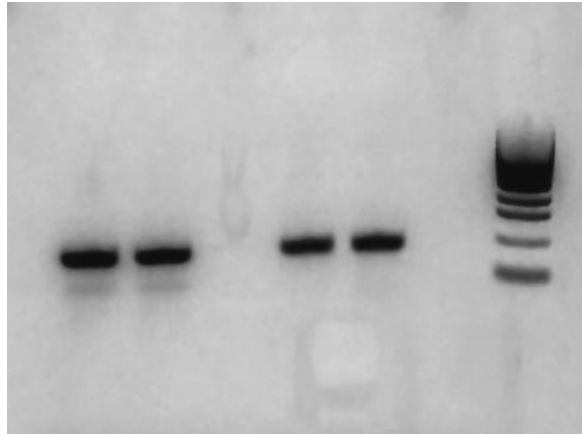
### **Digestión de los insertos**

Para la digestión del inserto productos de PCR se realizó la siguiente mix de reacción:

<b>Mix de reacción</b>
30 µl de ADN (inserto)
5 µl de buffer 10X
5 µl de EcoRI
5 µl de KpnI
5 µl de H <sub>2</sub> O

Una vez preparada la reacción ésta es incubada en el termociclador a 37°C durante una hora. Posteriormente, los productos de la digestión son sometidos a una electroforesis en gel de

agarosa, a 150 V durante 20 minutos, cargando la máxima cantidad posible de la muestra en los pocillos.



**Figura 8. Las dos primeras bandas se corresponden con la digestión del inserto #13.**

A partir de estas bandas se llevó a cabo una purificación empleando el kit GeneClean® (MP Biomedicals).

### **Digestión del vector pSyn\_6**

El vector pSyn\_6 fue digerido con las enzimas de restricción EcoRI y KpnI, en reacciones separadas.

Para la primera reacción se preparó la siguiente mix:

Mix de reacción
30 µl de ADN (vector)
5 µl de buffer 10X
5 µl de EcoRI
10 µl de H <sub>2</sub> O

Se introduce en el termociclador a 37°C durante una hora y, posteriormente, se realiza un choque térmico a 80°C para desactivar a la enzima. Antes de llevar a cabo la segunda reacción es necesario purificar la muestra, para ello se empleó el kit MicroElute DNA Clean Up (Omega).

Para la segunda reacción:

#### Mix de reacción

---

30 µl de ADN (purificación)

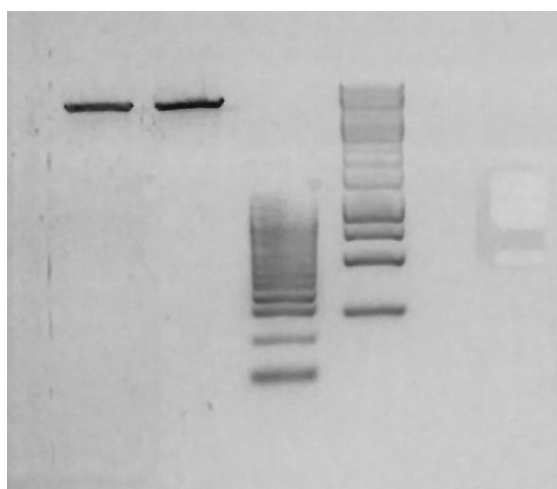
5 µl de buffer 10X

5 µl de KpnI

10 µl de H<sub>2</sub>O

---

Se vuelve a introducir en el termociclador a 37°C durante una hora y se realiza el choque térmico. Por último, con el producto de la digestión se lleva a cabo una electroforesis en gel de agarosa, con las mismas condiciones, cargando 10 µl de la muestra en cada pocillo.



**Figura 9. Las dos bandas se corresponden con la digestión del vector pSyn\_6.**

Introducción de los insertos en el vector pSyn\_6 (ligación del vector, transformación de células competentes de *E. coli*, Screening PCR como subtítulos)

#### **Ligación del vector**

Con este paso logramos circularizar el vector conteniendo el inserto de interés. Para ello se llevó a cabo la siguiente reacción:

#### Mix de ligación

---

1 µl de vector

2.5 µl de inserto

1 µl de buffer 5X

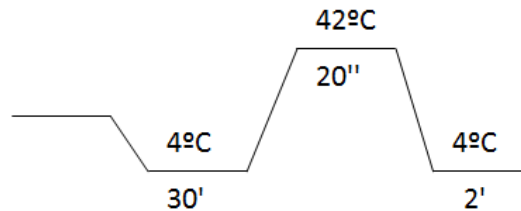
0.5 µl de ligasa

---

Posteriormente, se incorpora la reacción en el termociclador a 22°C durante 30 minutos.

### **Transformación de células competentes de *E. coli***

Se emplearon células competentes TOP10 de *E. coli*, previamente descongeladas en hielo, ya que se almacenan en criocongelación a -80°C, debido a su gran sensibilidad. Por cada reacción se emplean 25 µl de estas células competentes y se vuelve a introducir en el termociclador, esta vez con las siguientes condiciones:



Posteriormente, se incorpora la reacción de transformación en un tubo Eppendorf de 1.5 ml con 950 µl de medio LB (Luria-Bertani), atemperado a 37°C. Luego, se incuba a 37°C en agitación a 225 r.p.m. durante una hora. Pasado el tiempo, se sembraron 300 µl de la transformación en placas selectivas, conteniendo espectinomicina a una concentración de 50 µg/ml. Éstas son incubadas a 37°C hasta el día siguiente, aproximadamente unas 7-8 horas.

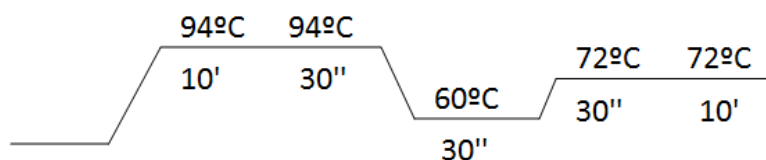
### **PCR screening**

Al día siguiente, con las colonias obtenidas en la placa se realiza una PCR screening. Ésta técnica se emplea para comprobar si las colonias de transformantes contienen el inserto de interés en su ADN. Para ello se seleccionan unas cuantas colonias, normalmente entre 5-10 colonias, y se resuspenden en 12 µl de agua estéril. De esos 12 µl se toman 2 µl y se siembran en una placa selectiva conteniendo espectinomicina. Previamente, se dibuja una cuadrícula sobre la placa para poder sembrar cada colonia en un recuadro, facilitando con ello el screening. Esta placa se incuba a 37°C hasta el día siguiente. Con los 10 µl restantes se procede a realizar la PCR:

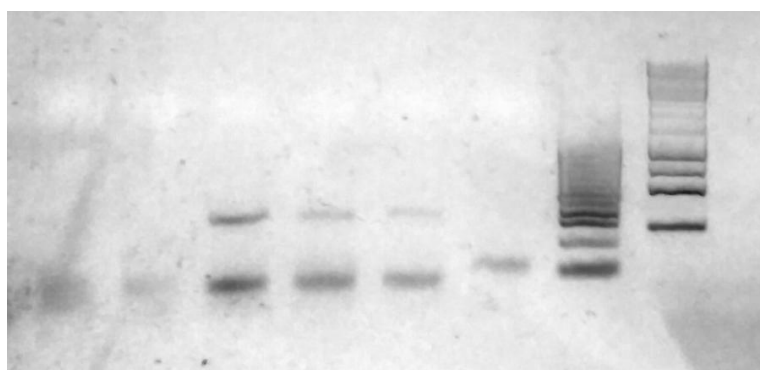
Mix de PCR
10 µl de ADN
5 µl de buffer 10X
1 µl de dNTPs
1 µl de primer forward
1 µl de primer reverse

0.25 $\mu$ l de taq polimerasa
31.75 $\mu$ l de H <sub>2</sub> O
Volumen total de 50 $\mu$ l

La reacción de PCR se introduce en el termociclador con las siguientes condiciones:



Finalmente, los productos de PCR son analizados mediante electroforesis en gel de agarosa.



**Figura 10. PCR screening del inserto #13.**

### Minipreparación de ADN plasmídico (Miniprep) y secuenciación

Para la minipreparación se empleó el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific).

Las concentraciones de ADN obtenidas tras la miniprep fueron las óptimas para poder llevar a cabo la secuenciación y la posterior transformación de la cianobacteria (Tabla 3).

**Tabla 3. Concentración de ADN.**

Inserto	Concentración ADN (ng/ $\mu$ l)
#13	93.41

Seguidamente se procedió a enviar estas muestras de ADN plasmídico, correspondientes al inserto ya clonado en el vector pSyn\_6, para su secuenciación. Esta secuenciación se realizó en un servicio de Secuenciación de Secugen, Madrid. Se prepararon 10  $\mu$ l de la muestra de

ADN plasmídico, a los que se le añaden 0.5  $\mu$ l del primer correspondiente, a una concentración de 10  $\mu$ M. Se agita bien la preparación, se etiqueta correctamente y se envía al servicio.

Tras los resultados se pudo comprobar que el clonaje de los péptidos había sido correcto.

### **Transformación de *Synechococcus elongatus***

Una vez tenemos la construcción (vector pSyn\_6 que contiene el inserto de interés) preparada se procede a transformar *Synechococcus elongatus* PCC 7942 para introducirla en su genoma. Para ello, se requiere de un paso previo de descongelación. Primero se transfieren las algas desde  $-80^{\circ}\text{C}$  a un contenedor de hielo seco, para minimizar las fluctuaciones de temperatura. Se añaden 6 ml de medio BG-11 precalentado a temperatura ambiente. Luego se incorporan a un baño de agua a  $34^{\circ}\text{C}$  hasta que se descongelen, aproximadamente durante 2 minutos, para posteriormente transferir 100  $\mu$ l a un Erlenmeyer con 6 ml de medio BG-11. Por último, se incorpora el Erlenmeyer a la cámara de cultivo SANYO environmental test chamber modelo MLR 352 H a  $34^{\circ}\text{C}$ , una humedad del 43% y una iluminación de 3 LS. Se incuba en agitación suave a 100-200 r.p.m.



**Figura 11. Cultivo de *Synechococcus elongatus* PCC 7942.**

Para llevar a cabo la transformación es necesario que el cultivo de *S. elongatus* alcance una densidad óptica de entre 1-2, medida a 750 nm. Se toman 1.5 ml del cultivo, se transfieren a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se centrifuga a máximas r.p.m. durante 3 minutos. Se desecha el sobrenadante y se resuspende el pellet en 1 ml de medio BG-11, para volver a centrifugar a máximas r.p.m. durante 1 minuto, desechando de nuevo el sobrenadante. Por último, se



añaden 100 µl de medio BG-11 y 5 µl del ADN, y se incubó en termobloque a 34°C durante 4 horas, tapando con papel de plata para proporcionar oscuridad total.

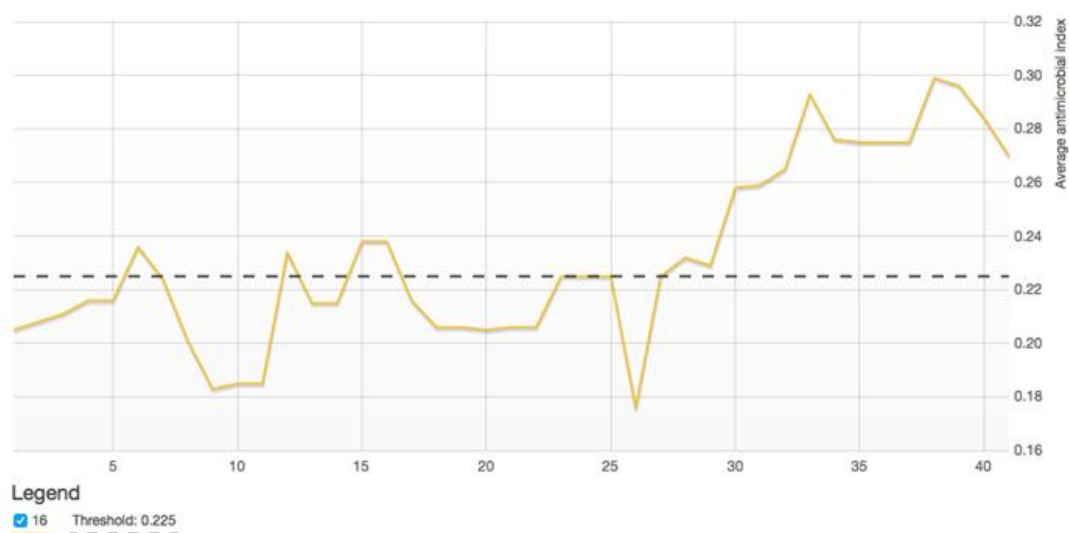
Tras la incubación se añaden 80 µl y 5 µl por cada transformación en placas selectivas separadas de BG-11 agar, conteniendo espectinomina a una concentración de 10 µg/ml, y precalentadas a temperatura ambiente. Estas placas son incubadas durante 5-7 días hasta que se produzca crecimiento.

Pasado el tiempo de incubación no llegamos a obtener crecimiento de las algas, por lo que se debe repetir la transformación (pendiente de concluir para este trabajo).

### Estudio *in silico* de propiedades relacionadas con la actividad antimicrobiana

La herramienta on line APD3 calculó el índice de hidrofobicidad del inserto #13, que era del 26%, así como su carga neta, de +7, y un índice Boman de 2,92 kcal/mol.

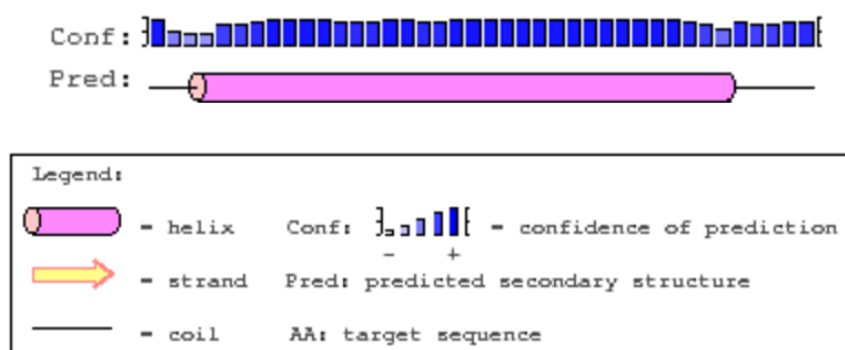
Para calcular las regiones del péptido #13 con posible actividad antimicrobiana se usó la herramienta AMPA, que predijo dos regiones antimicrobianas. La primera región comprende los residuos del 2 al 15, con un valor de propenso de 0.227 y una probabilidad del 10%. La segunda región estaba comprendida entre los residuos del 18 al 30, con un valor de propenso de 0.234 y una probabilidad del 16%. Los valores de probabilidad corresponden a la probabilidad de encontrar esta región en una proteína no antimicrobiana (Figura 12).



Protein:	16
Mean:	0.232
Stretch:	2
#1	From 2 To 15 Propensity 0.227 Prbity 10 % RSGNLGRLIRKGGE
#2	From 18 To 30 Propensity 0.234 Prbity 16 % GKKIERVQRIKE

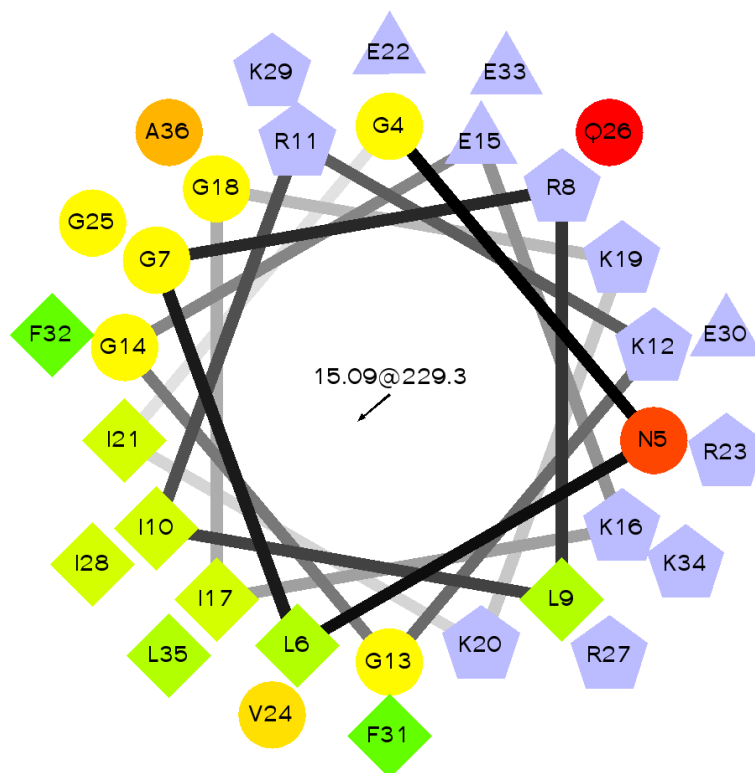
**Figura 12. Resultado AMPA.** Este gráfico muestra el perfil antimicrobiano para la secuencia. El eje X informa sobre la posición del aminoácido en la proteína y en el eje Y se muestra la puntuación (score) antimicrobiana de esa posición. Los valores de probabilidad que se muestran corresponden a la probabilidad de error de clasificación, es decir, la probabilidad de encontrar en el tramo predicho una péptido no antimicrobiano.

La estructura secundaria del péptido #13 fue computada con la herramienta PSIPred, que predijo una región de hélice comprendida entre los residuos 3 al 13 (Figura 13).



**Figura 13. Resultado del examen de la estructura secundaria del péptido #13, obtenido mediante la herramienta on line PSIPred.**

Para estudiar el carácter anfipático de la hélice comprendida entre los residuos 3 y 13 del péptido #13 se representaron estos residuos en proyección helicoidal, gracias al visor disponible on line (Figura 14) donde se observó que los residuos cargados positivamente de lisinas (K12, K16, K20, K29, K34) y argininas (R8, R11, R23, R27 y R34), se disponían hacia el mismo lado, generando así una hélice anfipática, característica de los péptidos antimicrobianos.



**Figura 11. Proyección helicoidal de los residuos 3 al 13 del péptido #13, obtenida con el visor disponible en <http://rzlub.ucr.edu/scripts/wheel/wheel.cgi>. Los pentágonos azules se corresponden con los residuos cargados positivamente, mientras que los rombos verdes se corresponden con residuos hidrofóbicos.**

## Discusión

Existen inconvenientes a la hora de implementar y comercializar péptidos antimicrobianos, y es que los costes de producción mediante métodos de síntesis convencionales son elevados y presentan una baja estabilidad. Por otro lado, su expresión en microorganismos procariontes entraña una mayor complejidad, debido principalmente a la propia toxicidad de los péptidos hacia las bacterias recombinantes. Las microalgas ofrecen numerosas ventajas en cuanto a la producción de péptidos antimicrobianos, ya que se tratan de sistemas sostenibles y económicos, que permiten una elevada acumulación de proteínas heterólogas en tejidos y compartimentos celulares específicos, con una fácil recuperación del producto de interés.

La cianobacteria *Synechococcus elongatus* presenta ciertas capacidades metabólicas que la hace idónea para la producción de sustancias de interés, siendo una plataforma biológica potencial de producción limpia y sostenible. Además, permite procesos de modificaciones

post-traduccionales para el correcto procesado de los péptidos. Comparado con otros sistemas de expresión, las microalgas poseen un gran número de ventajas (Tabla 4).

**Tabla 4. Comparativa entre los diferentes organismos como productores de péptidos antimicrobianos sintéticos.**

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 <sup>a</sup>	High <sup>a</sup>	High <sup>a</sup>	High <sup>a</sup>	Low	Very low
Cost/storage	Cheap/-20°C	Cheap/-20°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	<sup>b</sup>
Risk <sup>c</sup>	Yes	Unknown	Yes	Yes	Unknown	Unknown
Safety	Low	<sup>b</sup>	Medium	High	High	High
Ethical concerns	Low	Medium	Medium	High	Medium	Medium

Durante los últimos años, las microalgas han ido adquiriendo interés como fuente natural de compuestos valiosos y como biorreactores para la producción de proteínas recombinantes. Las microalgas transgénicas son fuente de compuestos de alto valor, como pigmentos naturales, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, y polisacáridos, presentando una amplia gama de aplicaciones en alimentación, cosmética y farmacéutica. Además, se pueden emplear como biorreactores para la producción de proteínas recombinantes terapéuticas e industrialmente relevantes. Esta tecnología muestra una gran promesa para simplificar el proceso de producción y, además, disminuir significativamente los costes de producción.

Sin embargo, existen determinados obstáculos para estos sistemas de expresión de proteínas como son la escasez de procedimientos estándares para la transformación genética de especies de microalgas de importancia comercial, la limitada disponibilidad de kits de herramientas moleculares para ingeniería genética, y los relativamente bajos niveles de expresión de proteínas recombinantes resultantes.

## Conclusiones

A partir del vector comercial pSyn\_6, y mediante herramientas de ingeniería genética, se ha logrado introducir una secuencia de ADN sintético que codifica para un péptido con acción antimicrobiana, y se ha verificado su correcto posicionamiento mediante secuenciación. Con esta construcción se han iniciado experimentos para la transformación de *Synechococcus*

*elongatus* PCC 7942, los cuales aún están pendientes de finalizar, una vez que se hayan resuelto los problemas con la transformación de la microalga.

Las conclusiones de este trabajo son las siguientes:

1. Mediante técnicas de PCR, digestión, ligación y transformación se ha logrado el clonaje molecular de una secuencia de DNA sintético correspondiente a un péptido antimicrobiano del manatí en el vector de expresión pSyn\_6 para cianobacterias.
2. El correcto posicionamiento de este inserto fue verificado mediante secuenciación.
3. El análisis *in silico* de la secuencia del péptido antimicrobiano del manatí muestra diferentes propiedades que se corresponden con su carácter antimicrobiano.
4. El análisis de la estructura secundaria del péptido antimicrobiano muestra que éste forma una hélice anfipática, característica de los péptidos antimicrobianos.
5. Se han iniciado las técnicas para transformar la microalga cianobacteria *Synechococcus elongatus* con esta construcción.

## Conclusions

From the commercial vector pSyn\_6, and through the use of genetics engineering's tools, it has been achieved the introduction of a synthetic DNA's sequence that codifies for an antimicrobial action peptide, and its position has been verified by sequencing. To transform the *Synechococcus elongatus* PCC 7942, experiments have been initiated with the previous construction. These experiments are about to finish, once the problems that appeared from the microalgae's transformation are solved.

The conclusions of this dissertation are the following:

1. By using PCR techniques , digestion, ligation and transformation, the molecular cloning of a synthetic DNA sequence corresponding to the manatee's antimicrobial peptide in the expression vector pSyn\_6 for cyanobacteria has been achieved.
2. The correct positioning of this insert was verified by sequencing.
3. The *in silico* analysis of the manatee's sequence of the antimicrobial peptide shows several properties that correspond to its antimicrobial character .
4. The analysis of the antimicrobial peptide's secondary structure shows that this element forms an amphipathic helix, which is a feature of antimicrobial peptides.
5. The techniques to transform the microalgae cianobacteria *Synechococcus elongatus* with this construction have been initiated.

## Bibliografía

1. 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.
2. Ganz T. *The role of antimicrobial peptides in innate immunity*. *Integr Comp Biol*, 2003;43:300-4.
3. 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.
4. Hale JDF, Hancock REW. *Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria*. *Exprt Rev Anti Infect Ther*. 2007. 5:951-9.
5. Hancock RE, Sahl HG. *Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies*. *Nat Biotechnol*. 2006. 24:1551-7.
6. Hancock RE. *Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials*. *Lancet Infect Dis*. 2001;1:156-64.
7. J. Castañeda-Casimiro, J. A. Ortega-Roque, A. Marcela, Venegas-Medina, A. Aquino-Andrade, J. Serafín-López, S. Estrada-Parra, I. Estrada. *Péptidos antimicrobianos: péptidos con múltiples funciones*, 2009. 18(1): p. 16-29.
8. Lehrer RI, Ganz T. *Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defense*. *Curr Opin Immunol* 1999. 11:23-7.
9. P. Guitiérrez, S. Orduz. *Péptidos antimicrobianos: estructura, función y aplicaciones*, 2003. 25(78): p. 5-15.
10. Rahnamaeian, M. *Antimicrobial peptides: modes of mechanism, modulation of defense responses*. *Plant Signal Behav*, 2011. 6(9): p. 1325-32.
11. 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.
12. S. Orduz Peralta. *Evaluación de péptidos sintéticos sobre bacterias, levaduras y mohos*. Tesis doctoral, Universidad Nacional de Colombia. 2012.
13. X. Escovar Langebeck, J.G. Chalela Mantilla. *Cutaneous antimicrobial peptides*. *Dermatol peru* 2004. 14:40-43.