
Universidad Autónoma Metropolitana

Iztapalapa



Tesis presentada por: Mtra. en Biól. Exp. Marisol Roldán Tapia¹

Director de Tesis: Dr. Armando Mejía Álvarez¹

Asesor Interno: Dr. Javier Barrios González¹

Asesores Externos: Dr. Josef Anné²

Dra. Ana Gisela Reyes Alvarado³

¹Laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolitos Secundarios. Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. ² Rega Institute, Katholieke Universiteit Leuven, Laboratory of Molecular Bacteriology, Minderbroedersstraat 10,B-3000 Leuven, Belgium. ³Conacyt-CIBNOR, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, BCS, México.

POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**SOBRE-EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE UN
PÉPTIDO ANTIMICROBIANO EN
STREPTOMYCES LIVIDANS TK24.**

T E S I S

que para obtener el grado de

DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A

Mtra. en Biól. Exp. Marisol Roldán Tapia

**SOBRE-EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE UN PÉPTIDO
ANTIMICROBIANO EN *STREPTOMYCES LIVIDANS* TK24.**

VoBo

Comité Tutorial:

Dr. Armando Mejía Álvarez
(DIRECTOR)

Dra. Ana Gisela Reyes Alvarado
(ASESORA)

Dr. Javier Barrios González
(ASESOR)

Miembros del Jurado:

Dr. (presidente): Javier Barrios González

Dra. (secretario): Ma. de Lourdes Villa Tanaca.

Dr. (Vocal): Ángel Eduardo Absalón Constantino

Dra. (Vocal): Ana Gisela Reyes Alvarado.

DEDICATORIA

A mi amada familia Rubén, Alicia, Guillermo, Adriana y José Luis, por estar junto a mí en todo momento e inculcarme los valores de la honestidad, la responsabilidad y el amor por lo que hago. Soy lo que cada uno ustedes han dejado en mí. Las herramientas más importantes para la vida me las han dado ustedes.

A mi amado esposo Humberto, a quien amo con todo el corazón. Por enseñarme a disfrutar de las cosas que realmente valen la pena en esta vida, aunque no sean fáciles.

¡LOS AMO!

AGRADECIMIENTOS

AGRADEZCO EL APOYO ECONÓMICO DEL CONACYT OTORGADO A TRAVÉS DE LA BECA NÚMERO 235027.

Al programa de Doctorado en biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa (UAMI), pertenece al programa nacional de posgrados de excelencia del CONACYT (PNPC).

A mis queridos padres Rubén y Alicia, que son lo máximo. Por su inmenso amor, paciencia y comprensión, por el gran esfuerzo que hicieron para que sus hijos saliéramos adelante, por motivarnos a ser águilas y no pollos; y a luchar por nuestros sueños.

A mis queridos hermanos, Guillermo, Adriana y José Luis. Por hacer mi vida hermosa y feliz, por fortalecerme en los momentos difíciles y por todas sus enseñanzas de vida.

A mi amado esposo Humberto, a quien disfruto tanto; quien me llena los ojos, el corazón y el alma. Por amarme como soy, por enseñarme a disfrutar de los verdaderos tesoros de esta vida, por creer en mí y ayudarme a crecer como persona "je t'aime mon cœur".

También quiero agradecer al Dr. Armando Mejía Álvarez, por haberme brindado la oportunidad de desarrollar el proyecto, por ayudarme a descubrir mi potencial, por hacerme una persona fuerte ante los fracasos, por ayudarme a entender que en esta vida el que persevera alcanza y por brindarme siempre lo que hay en su corazón. ¡Muchas gracias!

Al Dr. Josef Anné: Por tomarse el tiempo para convivir con nosotros, por su cariño y apoyo, por los plásmidos proporcionados para *E. coli*, y por todas sus palabras.

Al Dr. Javier Barrios González. Por ser siempre justo, por abrir siempre un espacio en su agenda para apoyarme, por compartir sus conocimientos.

A la Dra. Alejandra Serratos, por su valiosísima contribución en la secuenciación del péptido y por todos sus consejos.

A la Dra. Ana Gisela Reyes Alvarado, quién me dio la bienvenida al laboratorio. La persona más cercana a mí durante el desarrollo de toda la investigación, por todas esas horas de su tiempo compartidas conmigo, por todos conocimientos que puso a mí disposición, por su paciencia, apoyo y orientación, Por su profesionalismo y entrega, por ser excelente maestra y amiga.

Al Dr. Ulises Carrasco, por compartir sus conocimientos sobre las proteínas y por sus consejos para la realización de los geles de tricina.

A mis compañeros de laboratorio por recibirme con los brazos abiertos, por compartir sus conocimientos conmigo y por toda su ayuda.

Infinitas gracias a todos, ya que ustedes también han contribuido en el desarrollo de esta investigación.

Contenido

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
Abstract	5
INTRODUCCIÓN	6
MARCO CONTEXTUAL	9
Características estructurales de los AMPs	10
Clasificación de los AMPs	11
Péptidos hélice- α	11
Péptidos ricos en cisteína.	11
Péptidos de hoja- β	12
AMPs con alto contenido de un mismo aminoácido.	12
AMPs con aminoácidos modificados	12
Biosíntesis y secreción de AMPs	12
Regulación de la expresión genética en la síntesis de las defensinas	14
Mecanismo de Acción de los AMPs	14
Barril sin fondo (“barrel-stave”)	16
Poro toroidal (“toroidal pore”)	17
Alfombra (“carpet”).	18
Electroporación molecular.....	19
Balsas lipídicas que se hunden.	19
ANTECEDENTES	21
JUSTIFICACIÓN	26
HIPÓTESIS	28
OBJETIVOS	28

Objetivos Específicos.....	28
METODOLOGÍA	29
Análisis in silico de péptidos con posible actividad antimicrobiana.	31
Material biológico.....	32
Características de las cepas de clonación.	33
Escherichia coli BL21(DE ₃)pLysS.....	33
Streptomyces lividans TK24.....	33
Plásmidos.	34
Vector pET17-b	34
Vector pIJ486	35
Medios de cultivo.	36
Medio LB (1 litro)	36
Medio R ₂ (1 litro)	36
Medio YEME (1 litro).....	37
Medio S.....	37
Regulador PTC (1 litro).....	37
Solución de elementos traza (1 litro).....	37
Medio Phage (1 litro)	37
Medio Undecil (1 litro).....	37
Medio AN (1 litro).....	37
Actividad in vitro del péptido sobre fitopatógenos.	38
METODOLOGÍA PARA LA PRIMERA ESTRATEGIA.....	38
Construcción del sistema de expresión para Escherichia coli (DE ₃) pLysS.....	38
Selección de transformantes.....	39
Transformación de Escherichia coli BL21 (DE ₃) pLysS.....	39
Sobre-expresión heteróloga e Inducción en Escherichia coli	39
Pruebas de Actividad.....	40
METODOLOGÍA PARA LA SEGUNDA ESTRATEGIA.....	41
Modelamientos de la bisagra	42
Simulación del modelo de bisagra en caja de agua.....	43

METODOLOGÍA PARA LA TERCERA ESTRATEGIA	43
Clonación del minigen para <i>Streptomyces lividans</i> Tk24.	46
Protoplastos.....	46
Transformación de <i>Streptomyces lividans</i> Tk24 por protoplastos.	47
Selección de transformantes por PCR de Colonia	47
Condiciones de fermentación.....	47
Ensayos de actividad sobre fitopatógenos.	48
Bioensayos por pozo y Curva de concentración	49
Identificación y Perfil Densitométrico	50
Muestras concentradas	50
RESULTADOS.....	51
Primera estrategia	52
Segunda estrategia.	55
Medios de producción	68
Bioensayos por pozo y Curva de concentración	69
Perfil Densimétrico	70
DISCUSIÓN.	75
CONCLUSIÓN.....	80
ANEXO	81
REFERENCIAS.....	88

Índice de figuras

Figura 1. Modelo de barril sin fondo.....	17
Figura 2. Modelo de poro toroidal.....	18
Figura 3. Modelo de alfombra:.....	19
Figura 4. Representación Esquemática de un péptido señal.....	24
Figura 5. Diagrama de la estrategia a seguir.....	31
Figura 6. Mapa del plásmido de expresión pET17-b.....	34
Figura 7. Mapa del plásmido de expresión pIJ486.....	35
Figura 8. Secuencia de aminoácidos para el modelo de bisagra.....	42
Figura 9. Transformantes de Escherichia coli BL21 (DE3) pLysS.....	53
Figura 10. Cinética de crecimiento e Inducción de las transformantes y la cepa control.....	54
Figura 11. Bioensayos de actividad en pozos del péptido sobre diferentes fitopatógenos.....	55
Figura 12. Estructuras del modelamiento de la bisagra.....	56
Figura 13. Diagrama de Ramachandran.....	58
Figura 14. Modelo para la propuesta de inactivación por bisagra.....	59
Figura 15. Simulación en caja de agua.....	60
Figura 16. Rmsd de la bisagra a lo largo de 100ns.....	61
Figura 17. Casette de expresión para Streptomyces lividans.....	62
Figura 18. Vector pIDT smar.....	63
Figura 19. Transformantes de Streptomyces lividans TK24.....	64
Figura 20. PCR de colonia realizado en las transformantes de Streptomyces lividans Tk24.....	65
Figura 21. Secuenciación y alineamiento.....	65
Figura 22. Cobertera de Bacillus subtilis.....	66
Figura 23. Transformante sin cobertera.....	66
Figura 24. Transformante con cobertera de Bacillus subtilis.....	67
Figura 25. Cepa progenitora con cobertera de Bacillus subtilis.....	67
Figura 26. Inhibición total de la transformante a mayor concentración.....	67
Figura 27. Inhibición de la transformante sobre Bacillus subtilis.....	67

Índice

<i>Figura 28. Diferencia en la coloración de las cepas probadas.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 29. Bioensayos en pozos por difusión.....</i>	<i>69</i>
<i>Figura 30. Gel de tricina realizado para el estándar (péptido sintético).....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 31. Gel de tricina para el estándar y el sobrenadante.....</i>	<i>71</i>
<i>Figura 32. Gel de tricina realizado para el sobrenadante.....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 33. Gel de tricina para el estándar y muestras de sobrenadante.....</i>	<i>74</i>

Índice de tablas.

<i>Tabla 1. Fitopatógenos probados.....</i>	<i>32</i>
<i>Tabla 2. Cepas y plasmidios usados en el proyecto.....</i>	<i>36</i>
<i>Tabla 3. Modificaciones al medio de producción.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabla 4. Estructuras y medidas de confiabilidad para los modelos realizados en I-TASSER.....</i>	<i>57</i>
<i>Tabla 5. Condiciones para PCR.....</i>	<i>64</i>
<i>Tabla 6. Perfil densitométrico realizado a las muestras de péptido sintético.....</i>	<i>71</i>
<i>Tabla 7. Perfil densitométrico realizado a las muestras de sobrenadante.....</i>	<i>73</i>
<i>Tabla 8. Perfil densitométrico realizado a las muestras de péptido sintético y sobrenadante.....</i>	<i>74</i>

Abreviaturas

ABREVIATURAS

μg	Microgramos	dNTPs	desoxirribonucleótidos trifosfatos
μL	Microlitro	DO	densidad óptica
°C	Grados centígrados	Fw	primer forward
ADN	Ácido desoxirribonucleico	G	Guanina
amp^R	Ampicilina	h	Horas
AMPs	Péptidos Antimicrobianos	IL	Interleucina
Atm	atmósfera	IPTG	Isopropil tio β D Galactosido
ATP	Adenosín trifosfato	Izq	Izquierda
C	Citosina	kDa	Kilodaltones
CAP'S	péptido catiónico con actividad antimicrobiana	L	Litro
CD14	Clúster de Diferenciación 14	LB	Luria-Bertani
CM	Cloranfenicol	lb	Libra
Der	Derecha	LfcinB	Lactoferricin B
DnaK	Proteína Chaperona DnaK		

Abreviaturas

LPS	Lipopolisacáridos	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Mg	Miligramos	PEG6000	Polietilénglicol 6000
Min	Minutos	PR-39	Péptido regulador de la angiogénesis
mL	Mililitros	RNA	Ácido Ribonucleico
mM	Milimolar	rpm	Revoluciones por minuto
mTNFα	factor α de necrosis tumoral murino	Rv	primer reverse
NaCl	Cloruro de Sodio	SPasas	peptidasas señales
NF-κB	Factor Nuclear kappa Beta	TAP	Péptido antimicrobial traqueal
NK	Natural Killer	TLR	Receptor de Tipo Toll
Ns	Nanosegundos	TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
PAMPS	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos	Vsi	inhibidor de subtilisina de <i>Streptomyces venezuelae</i>
PBC	Condiciones periódicas a la frontera		

RESUMEN

Los **péptidos con actividad antimicrobiana** (AMPs), son de bajo peso molecular y codificados en el genoma de animales y plantas. Típicamente, son **catiónicos**, anfipáticos, lo que les confiere estabilidad. (Boman, 1996). Se sintetizan en tejidos como la piel, intestino y pulmones (Rao, 1995), más rápido que una inmunoglobulina y a menor costo metabólico. Pueden estar disponibles para actuar inmediatamente y se liberan o producen cuando las células se estimulan por contacto con microorganismos (Nissen-Meyer y Nes, 1997; Rao, 1995). Son un medio rápido para combatir una amplia variedad de bacterias, hongos, virus e incluso protozoarios (Evans y Harmon, 1995). Debido a su mecanismo de acción, **no afectan a las células eucarióticas**; por ello se están estudiando intensamente. En la actualidad son usados como agentes antimicrobianos y como agentes terapéuticos (Boman, 1996),

En este trabajo, se desarrollaron tres estrategias moleculares con la finalidad de producir de manera eficiente un péptido catiónico con actividad antimicrobiana (CAP). La primera consistió en el uso de un sistema para *Escherichia coli* BL21 (DE3) *pLysS*, en donde el gen de interés se mantiene silenciado hasta que se administra un inductor (evitando así la toxicidad por expresión basal). En la segunda se modeló una secuencia complementaria al péptido de interés, con el fin de atenuar la toxicidad de este sobre la célula huésped. En la tercera se diseñó un *cassette* de expresión para *Streptomyces lividans* TK24, en el que se utilizó el promotor y el péptido señal de *Streptomyces venezuelae*, sistema que permitió la sobre-expresión y secreción de un péptido catiónico al medio de cultivo, facilitando su recuperación y la disminución de toxicidad sobre el organismo productor. Los resultados obtenidos muestran la eficiencia del sistema, se logró una concentración de 11.61 mg/ml de péptido, lo que representa un incremento de por lo menos diez veces con respecto a otras estrategias reportadas previamente (Parachin y col., 2012).

Resumen

Este sistema, consta de la construcción de un *cassette* de expresión, con elementos que permiten incrementar la eficiencia en la producción del péptido, tales como el promotor y el péptido señal de *Streptomyces venezuelae*. El péptido expresado mostró actividad contra diversos fitopatógenos, como: *Colletotrichum sp*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* *Bacillus subtilis*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas aurofaciens*, *Nigrospora oryzae*, *Pseudomonas syringae pv. tomato* *Ralstonia solanacearum* y *Xanthomonas axonopodis pv. Citri*.

Por otro lado, se sentaron las bases para realizar la expresión del péptido modificado hipotéticamente inactivo en *Escherichia coli BL21 (DE3) pLysS*.

ABSTRACT

With the biotechnological tools that exist today, it has been developed different systems of heterologous production for toxic proteins potentially applicable at industrial level. Two strains which have been developed as part of heterologous expression systems are *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS and *Streptomyces lividans* Tk24. The latter's system offers the advantage of secreting this type of protein into the culture medium, facilitating the purification and avoiding its toxicity, this is achieved by fusing the protein of interest (in our case a peptide), to a signal peptide isolated from a homologue, which facilitates secretion. In the case of *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS, we have been able to develop some systems in which the gene of interest was keeping silencing until an inductor was administered (thus avoiding toxicity basal expression).

In the present study, we developed three molecular strategies, in order to efficiently produce a peptide with antimicrobial activity. The first one consist of the use of a system for *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS that helps us to keep repressed the gene of interest, the second is a complementary sequence model so as to the inactivation of the peptide and in the third one a *cassette* of expression for *Streptomyces lividans* TK24 was designed, that helps to secrete the peptide thus avoiding toxicity.

The results showed that the expression system of *Streptomyces lividans* Tk24 is an effective model in which it could be possible to express the peptide with antimicrobial activity against *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aurofaciens* and *Xanthomonas campestris*, on the other hand we laid the foundations for carry out the expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS of the peptide modified hypothetically inactive.

INTRODUCCIÓN

En México y en el mundo la horticultura es una de las actividades de mayor importancia económica. La producción de frutas y hortalizas ha ocupado hasta un 73 % de la producción total. En los últimos años, se ha visto afectada por la aparición de enfermedades causadas por microorganismos fitopatógenos, entre los que se encuentran bacterias, hongos, virus y nemátodos que ocasionan pérdidas de hasta el 100 % en la producción (Barboa y col., 2009). Estos microorganismos requieren la aplicación continua de productos químicos para su control, lo que provoca la aparición de cepas resistentes y repercusiones negativas tanto en la salud humana como en el medio ambiente; éstas son las razones principales por las cuales es necesario desarrollar nuevas alternativas que sustituyan los químicos y que disminuyan los efectos negativos. El usar los sistemas naturales de defensa de los organismos, podría disminuir el riesgo de generar organismos resistentes. En este sentido, los **péptidos con actividad antimicrobiana** (AMPs) son una alternativa prometedora ya que, al ser esenciales en la respuesta inmune innata, ejercen su efecto en una amplia gama de microorganismos, además son ubicuos en la naturaleza, menos susceptibles a crear resistencia y no afectan a las células eucarióticas.

Los AMPs son de bajo peso molecular (usualmente menores de 10k Da), a diferencia de otros antimicrobianos producidos por acción enzimática (como la penicilina), son codificados en el genoma de animales y plantas. Típicamente, son moléculas catiónicas, anfipáticas, características que les confiere estabilidad en ambientes tanto acuosos como hidrofóbicos. Pueden presentar modificaciones post-traduccionales como glicosilación, circularización, amidación de los extremos y modificación de aminoácidos incluyendo D-aminoácidos (Boman, 1996). Se sintetizan principalmente en tejidos como la piel, intestino y pulmones. Las células sanguíneas de defensa también son productoras importantes de AMPs (Rao, 1995). Además de sintetizarse hasta cien veces más rápido que una

Introducción

inmunoglobulina y a mucho menor costo metabólico, pueden almacenarse en altas concentraciones, estar disponibles para actuar inmediatamente y se liberan o producen cuando las células se estimulan por contacto con microorganismos (Nissen-Meyer y Nes, 1997; Rao, 1995). Los AMPs son un medio rápido, no específico para combatir una amplia variedad de bacterias, hongos, virus e incluso protozoarios (Evans y Harmon, 1995). Los AMPs, se clasifican de acuerdo a su carga neta en **péptidos antimicrobianos catiónicos** (CAP's) y aniónicos, siendo los primeros los de mayor actividad.

Una característica importante de los CAP's, es que a pesar de que combaten un amplio espectro de microorganismos, debido a su mecanismo de acción, **no afectan a las células eucarióticas**; por ello, los CAP's se están estudiando intensamente y se usan en la actualidad como agentes antimicrobianos con aplicación en la producción de alimentos y como agentes terapéuticos (Boman, 1996), también se ha propuesto el uso de CAP's heterólogos en la lucha contra fitopatógenos, en su mayoría relacionados a plantas transgénicas que forman resistencia a un fitopatógeno específico (Rao, 1995).

Los CAP's juegan un papel importante en el sistema inmune, debido a su potente actividad antimicrobiana sobre un amplio espectro de microorganismos. Su actividad, se efectúa sobre la membrana de las células blanco causando desestabilización y estrés. ¿Cómo lo consiguen? Los mecanismos de acción son diversos, pero en su mayoría actúan sobre la membrana citoplasmática de las células blanco ya que contienen una capa exterior poblada con cargas negativas que interactúan con las cargas de los péptidos causando permeabilidad (Marcos y col., 2008). Sin embargo, debido a que las membranas de células eucariontes no tienen lípidos cargados negativamente en su superficie y al contenido de colesterol, que contribuye a estabilizar las membranas y a reducir la interacción con péptidos de carga positiva, esta actividad no puede llevarse a cabo pues no se logra la desestabilización, lo que confiere ventajas para su aplicación (Hancock y

Introducción

[Lehrer 1998](#); [Peschel y Sahl 2006](#); [Yeaman Yount 2003](#); [Zasloff, 2002](#)). Además, debido a esto la probabilidad de que los microorganismos expuestos a su actividad desarrollen resistencia es baja.

Desafortunadamente, aun cuando se podrían aplicar en la agricultura, su producción es costosa ya que se producen principalmente de manera sintética. A este respecto, la ingeniería genética podría ser una alternativa para su síntesis, pero la expresión de CAP's en bacterias es complicada, debido a la toxicidad de estos sobre el hospedero y a su degradación por las proteasas del organismo productor al ser expresados de forma heteróloga ([Zhang y col; 1998](#)).

MARCO CONTEXTUAL.

Los microorganismos son la forma de vida más abundante en el planeta, siendo muchos de ellos potencialmente patógenos para otros seres vivos. Plantas y animales los han combatido mediante el desarrollo de sistemas de defensa que se han agrupado en dos categorías: innatas o naturales y adquiridas o adaptativas. Las primeras, son comunes en todos los individuos y los protegen contra la colonización, infección y enfermedades causadas por patógenos, están siempre disponibles y tienen una especificidad limitada; sin embargo, pueden no ser suficientes para proteger al hospedero contra la invasión. Los patógenos que evaden o superan las defensas innatas, usualmente son susceptibles a las defensas adquiridas, también llamadas inducibles, debido a que se inducen o activan por la exposición del hospedero al patógeno; no están disponibles previo al encuentro, son específicamente dirigidas contra él y tienen la capacidad de “recordar” el primer encuentro para desarrollar una respuesta más rápida, efectiva y duradera, frente a encuentros posteriores con el mismo patógeno (Boman, 1996).

Alexander Fleming fue el primero en observar que las secreciones respiratorias tenían poderes bactericidas. La lisozima fue la causante de esta actividad y la primera proteína antimicrobiana registrada; desde entonces se han encontrado otras proteínas y péptidos que tienen también una función antimicrobiana (Zasloff, 2002). En los últimos años se han descrito diversas moléculas efectoras de la respuesta innata como los péptidos con actividad antimicrobiana o AMPs por sus siglas en inglés, que muestran especificidad hacia componentes de la pared celular microbiana como lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram-negativas, glicolípidos de micobacterias, ácido lipoteicoico de bacterias Gram-positivas, b-glucanos de levaduras y dobles cadenas de RNA virales (Boman, 2000; Hoffmann y col., 1999).

Características estructurales de los AMPs.

Su tamaño varía desde seis residuos de aminoácidos, para péptidos aniónicos, a más de 59 para algunos péptidos catiónicos. También se han reportado dipéptidos y tripéptidos que poseen actividad antimicrobiana. Los péptidos catiónicos son ricos en arginina y lisina. Pueden adoptar estructuras secundarias, incluyendo hélice- α y estructuras antiparalelas de lámina β . En general, los péptidos son más activos cuando presentan una estructura secundaria mejor definida. La hidrofobicidad característica de algunos péptidos, les permite insertarse dentro de la bicapa lipídica, y mediante la anfipaticidad pueden interactuar con las regiones polares y apolares de ella. Esta última es una propiedad determinada por la alineación de aminoácidos hidrofílicos en un lado de la molécula helicoidal, y de aminoácidos hidrofóbicos en el lado opuesto (Broekaert y col., 1997; García-Olmedo y col., 1998; Van Loon y col., 2006).

Los AMPs comparten ciertas características estructurales comunes, tales como (1) su composición por aminoácidos: los residuos más abundantes en los AMPs catiónicos son (arginina y lisina), mientras que los péptidos α aniónicos son ricos en ácidos aspártico y glutámico y en el caso de los hidrofóbicos (triptófano, fenilalanina e isoleucina); (2) Carga neta: la mayoría de los AMPs están cargados positivamente a pH fisiológico, aunque existe un número menor de péptidos aniónicos, (3) Anfipaticidad: conferida por su composición de aminoácidos y su disposición (4) Una notable diversidad de estructuras y conformaciones, incluyendo hélices- α , hojas- β , estructuras no convencionales o incluso conformaciones extendidas (los dos últimos son especialmente abundantes en AMPs cortos). La mayoría de estas estructuras son anfipáticas y son inducidas en determinadas condiciones experimentales, lo que facilita su interacción con la bicapa lipídica; de hecho, la penetración de la membrana biológica por anfipaticidad de AMPs es una propiedad característica relacionada con la actividad antimicrobiana (Broekaert Y col, 1997; García-Olmedo y col., 1998; Van Loon y col., 2006).

Clasificación de los AMPs.

Pese a la diversidad de origen y las modificaciones evolutivas, los AMPs han podido ser clasificados con base en su secuencia y estructura (Boman, 1996; Hwang, 1990). En la actualidad se conocen 5 grupos de AMPs que característicamente tienen: 1) hélice- α , 2) alto contenido de cisteína, 3) hojas- β , 4) alto contenido de un mismo aminoácido y 5) aminoácidos modificados. Estos últimos se han descrito en bacterias y hongos.

Péptidos hélice- α

A este grupo pertenecen las cecropinas y las magaininas, entre otros. Estos AMPs no contienen cisteína, en sistemas acuosos son extendidos, pero adoptan una conformación de hélice- α en solventes orgánicos como trifluoroetanol (reproduce las condiciones hidrofóbicas de membrana), lo cual explica su acción a nivel de membrana. La hélice presenta una superficie hidrofóbica y otra altamente positiva que les permite interactuar con los lípidos de las membranas (Boman, 1996; Hwang, 1990; Matsuzaki, 1998)

Péptidos ricos en cisteína.

A este grupo pertenecen las defensinas, las cuales van de 3 a 5 kDa y se agrupan en varias clases según la localización de los pares de cisteína, estructura tridimensional y similitud de secuencias. Se incluyen las defensinas- α y β de vertebrados y las defensinas de plantas e insectos. Estas últimas son las de mayor tamaño y tienen una estructura hélice- α que no presentan las defensinas de vertebrados. Las defensinas- α fueron detectadas primero en los gránulos de leucocitos y posteriormente en células de Paneth del intestino delgado. En vertebrados las defensinas- β se expresan en células epiteliales y leucocitos. En su conjunto, las defensinas son activas contra muchas bacterias, hongos, levaduras y virus envueltos. Se ha demostrado que algunas defensinas también presentan

Marco Contextual

actividad quimotáctica, mitogénica, corticostática y citotóxica (Evans y Harmon, 1995; Yang y col., 1999; Yu y col., 2000).

Péptidos de hoja-β.

Se caracterizan por tener aproximadamente 20 residuos y uno o dos enlaces disulfuro que estabilizan su estructura de hojas-β antiparalelas. A este grupo pertenecen polifemusina II, y lactoferrina B (Hwang, 1990).

AMPs con alto contenido de un mismo aminoácido.

Tienen una alta concentración relativa de un mismo aminoácido, el cual puede ser triptófano, prolina o histidina como es el caso de las apidaecinas, abaecina, drosocina, protegrinas y catelicidinas. Su estructura presenta diferentes patrones en soluciones acuosas, pero se vuelven estables en presencia de fosfolípidos (Boman, 1996; Evans y Harmon, 1995; Hwang, 1990).

AMPs con aminoácidos modificados

Normalmente péptidos catiónicos enriquecidos con aminoácidos específicos, como la abaecina de las abejas, adicionada con prolina, la profenina de cerdo, la indolicidina de ganado y la histatina de primates (Hancock y Lehrer 1998).

Biosíntesis y secreción de AMPs.

Los AMPs se codifican en el genoma como propéptidos, con un extremo N-terminal de péptido clásico. Se almacenan intracelularmente y se liberan extracelularmente. Como la mayoría, son moléculas catiónicas que pueden ser tóxicas para los organelos intracelulares, durante el transporte intracelular se mantienen como propéptidos inactivos. El pro-segmento aniónico neutraliza funcionalmente el péptido catiónico permitiendo así su transporte. Algunos AMPs se han aislado de una gran variedad de animales (vertebrados e invertebrados), plantas, bacterias y

Marco Contextual

hongos y son producidos por diferentes tipos celulares que se encuentran distribuidos en todo el cuerpo, formando parte de la respuesta primaria a patógenos, como macrófagos, neutrófilos, queratinocitos, hemocitos, grasa corporal, células epiteliales del tracto respiratorio, del tracto reproductivo y del tracto genitourinario; células de Paneth en el intestino delgado, células asesinas naturales o *Natural Killer* (NK), células cebadas y en glándulas endocrinas. Estos péptidos poseen actividad de amplio espectro contra una amplia gama de microorganismos, incluidas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, protozoos, levadura, hongos y virus (Reddy y col., 2004).

En los vertebrados, la síntesis de los péptidos antimicrobianos es constitutiva, pero se puede inducir por respuestas inflamatorias mediadas por citocinas y macromoléculas microbianas. Por ejemplo, la B-defensina de la tráquea bovina (*tracheal antimicrobial peptide*, TAP) es sintetizada cuando se expone la vía aérea a bacterias o lipopolisacáridos inhalados (Diamond y col., 1996). Esta respuesta, iniciada por los receptores de lipopolisacáridos, se traduce en reguladores de la transcripción que incluyen el complejo de NF-KB y actúan en los motivos de unión NF-KB en el promotor de gen TAP. Además de la regulación por síntesis de la transcripción, un nivel adicional de control y especificidad se da en la acumulación de estos péptidos en células efectoras, como granulocitos, neutrófilos y macrófagos, en mamíferos y hemocitos en insectos. Estas células tienen mecanismos que controlan la liberación de gránulos de este tipo de sustancias, dependiendo de los estímulos específicos (Ganz., 2003).

En los invertebrados, los péptidos antimicrobianos se caracterizan por su rápida síntesis y secreción hacia la hemolinfa después de una infección microbiana y se ha encontrado que sus genes se encuentran principalmente activos en el cuerpo graso y los hemocitos (Kaneko y col., 2007).

Marco Contextual

En los mamíferos se ha encontrado que las células de Paneth, ubicadas en el fondo de las criptas del intestino delgado, liberan sus gránulos ricos en defensinas en respuesta a una estimulación colinérgica o un estímulo bacteriano (Ouellette y Selsted., 1996).

Regulación de la expresión genética en la síntesis de las defensinas.

La expresión de β defensinas producidas en el riñón son el resultado de la estimulación de células por la presencia de IL-1 β (Interleucina 1beta), TNF α (factor de necrosis tumoral alfa) y LPS (lipopolisacáridos) (Liu y col., 2003). Existe una gran variedad de Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPS), entre los que se encuentran el LPS de las bacterias Gram-negativas y las lipoproteínas de bacterias Gram-positivas. Los diferentes PAMPS interactúan con receptores celulares como CD14, TLR4 (Toll-Like Receptor) y TLR-2 (Schutte y col., 2002). Posterior al reconocimiento de estas moléculas, se inicia una cascada de señalización que finaliza con la translocación del factor nuclear NF- κ B hacia el núcleo y la consecuente transcripción de los genes que codifican para las defensinas (Birchsler y col., 2001).

Mecanismo de Acción de los AMPs.

Su efectividad y selectividad se basa en las diferencias de diseño de las membranas de microorganismos procariontes y eucariontes superiores. Mientras que la membrana de las bacterias posee una capa exterior a la bicapa poblada de lípidos con cabeza de fosfolípidos de carga negativa, la misma capa exterior de la membrana de plantas y animales se compone de lípidos sin carga (Hancock y Lehrer 1998; Peschel y Sahl 2006; Yeaman Yount 2003); la mayoría de los lípidos con carga negativa se encuentran en este caso ubicados en la capa interior. Adicionalmente, el colesterol encontrado en los animales contribuye a estabilizar las membranas y reducir la interacción con péptidos de carga positiva (Zasloff,

2002). El modo de acción de los péptidos catiónicos anfipáticos radica en su interacción con los lípidos de las membranas de los microorganismos.

Para llevar a cabo su función microbicida, los AMPs utilizan uno de los siguientes mecanismos: a) interferir en la síntesis de enzimas metabólicas o del DNA, como en el caso de algunos AMPs de origen microbiano, cuyo proceso aún no es bien conocido; b) actuar directamente a nivel de la membrana celular ya sea alterando la permeabilidad o lisándola mediante la formación de canales o poros, como en el caso de los péptidos **hélice- α** (Nissen-Meyer y Nes, 1997; Shai, 1998).

Aunque se desconocen muchos detalles sobre los mecanismos de acción de los AMPs **hélice- α** , como las magaininas, se considera que actúan directamente en la membrana celular y que su secuencia de aminoácidos es importante (Matsuzaki, 1998), ya que si se sustituyen aminoácidos que alteren la polaridad del péptido, su actividad disminuye. Aparentemente no requieren receptores específicos, como se ha demostrado al sustituir aminoácidos por sus correspondientes D-enantiómeros sin alterar su actividad. Esto ha sido reforzado al demostrar, por resonancia magnética nuclear y dicroísmo circular, que el mecanismo de daño se inicia por una interacción electrostática. Este comportamiento molecular y su carácter catiónico hacen que los AMPs presenten una mayor afinidad por los fosfolípidos ácidos de las bacterias Gram-negativas y polisacáridos de las bacterias Gram-positivas, que por los fosfolípidos anfipáticos de las membranas de células de mamíferos. Lo anterior permite explicar la falta de citotoxicidad para las células animales y permite proponer a los AMPs como agentes terapéuticos altamente específicos (Matsuzaki, 1998; Nissen-Meyer y Nes, 1997; Shai, 1998).

En general, se ha propuesto que el mecanismo de acción de los AMPs está dado por los siguientes pasos:

- 1) La reacción inicia con la unión del AMPs y los fosfolípidos ácidos (LPS) de las membranas microbianas mediante fuerzas electrostáticas. Los monómeros de los

Marco Contextual

péptidos anfipáticos se acomodan en la superficie de la membrana de manera que la carga positiva de los aminoácidos básicos concuerde con las cabezas de fosfolípidos con carga negativa. (Hwang, 2000; Matsuzaki y col., 1998; Nissen-Meyer y Nes, 1997; Shai, 1998).

2) Cuando la concentración relativa entre el péptido y el lípido (P/L) localmente es baja, el péptido tiende a orientarse paralelamente en la membrana y es inactivo. Cuando la concentración local relativa del AMPs se incrementa, el péptido tiende a tomar una posición perpendicular a la membrana y se inserta, orientando los residuos hidrofóbicos hacia la región hidrofóbica de la membrana. La capacidad de "aceptación" de la membrana por una mayor cantidad de péptido dependerá de la composición lipídica y propiedades fisicoquímicas de la misma. Esto explica los diferentes grados de susceptibilidad de una célula por un determinado AMPs y la especificidad hacia ciertas bacterias. (Hwang, 2000; Matsuzaki y col., 1998; Nissen-Meyer y Nes, 1997; Shai, 1998).

3) Finalmente, la inserción de los péptidos en la bicapa lipídica altera la permeabilidad de la membrana o bien ocurre la lisis celular por la formación de poros (Hwang, 2000; Matsuzaki y col., 1998; Nissen-Meyer y Nes, 1997; Shai, 1998).

Se han descrito diferentes modelos de permeabilización de membranas por péptidos:

Barril sin fondo ("barrel-stave")

En este modelo, los péptidos unidos se agregan en la superficie y se insertan en la bicapa de modo que las regiones hidrofóbicas de los péptidos se alinean con la región del núcleo lipídico de la membrana, dejando las regiones hidrofílicas hacia el citosol. Se forma así un poro transmembranal muy similar a un barril sin fondo cuyas paredes son los péptidos helicoidales (Brogden, 2005).

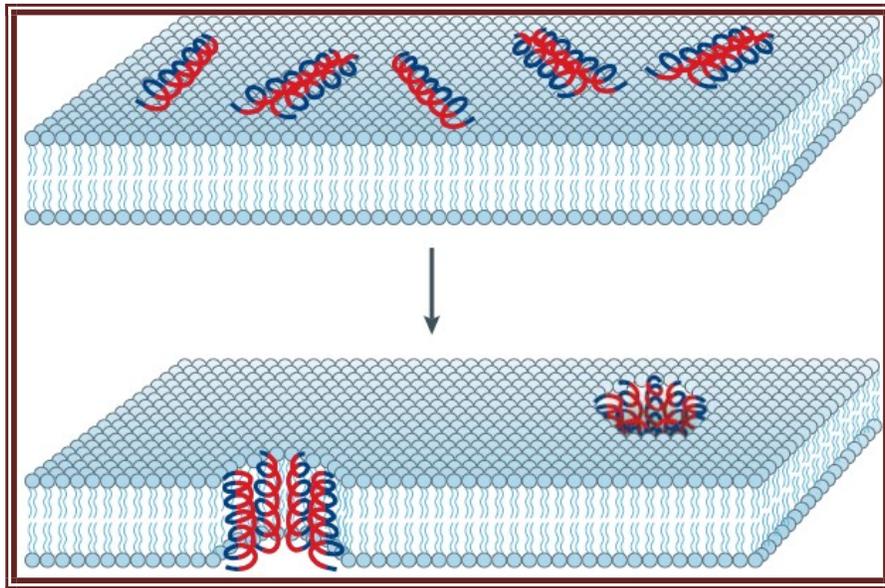


Figura 1. Modelo de barril sin fondo: Las regiones hidrofílicas del péptido se muestran de color rojo, las regiones hidrofóbicas del péptido se muestran de color azul (Brogden, 2005).

Poro toroidal ("toroidal pore").

En el modelo de poro toroidal, los péptidos unidos se agregan y se insertan en la membrana e inducen la monocapa de lípidos a curvarse a través del poro, de modo que las regiones polares de ambas capas de la membrana lleguen a unirse. Así, las paredes del poro quedan formadas por las cabezas polares de los lípidos de membrana y por los péptidos insertados en ella (Matsuzaki y col., 1998).

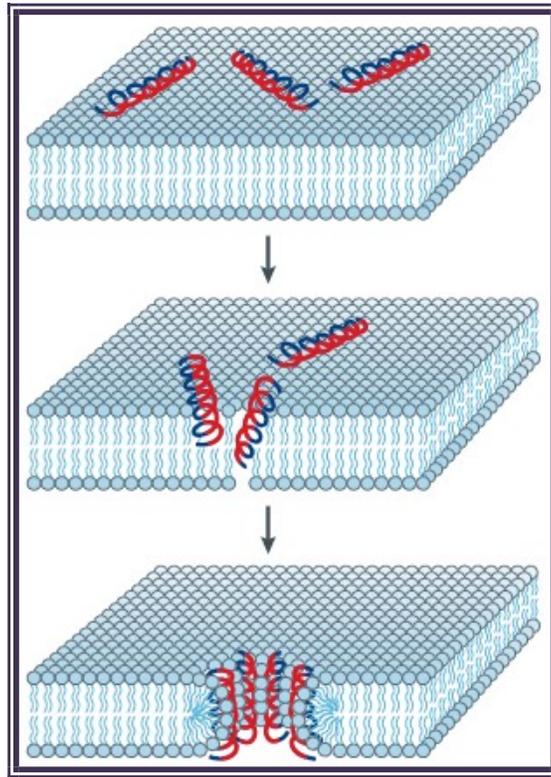


Figura 2. Modelo de poro toroidal: Las regiones hidrofílicas del péptido se muestran de color rojo, las regiones hidrofóbicas se muestran de color azul (Brogden, 2005).

Alfombra ("carpet").

En el modelo de alfombra, los péptidos se acumulan en la superficie de la bicapa cubriendo la superficie de la membrana celular como una alfombra. En altas concentraciones, estos péptidos interrumpen la continuidad de la membrana insertándose en la membrana en paralelo a la bicapa lipídica, mediante sus regiones hidrofóbicas. Las regiones polares de los péptidos quedan expuestas al exterior, de modo que actúan de manera similar a los detergentes para desintegrar finalmente la membrana formando micelas (Dagan y col., 2002).

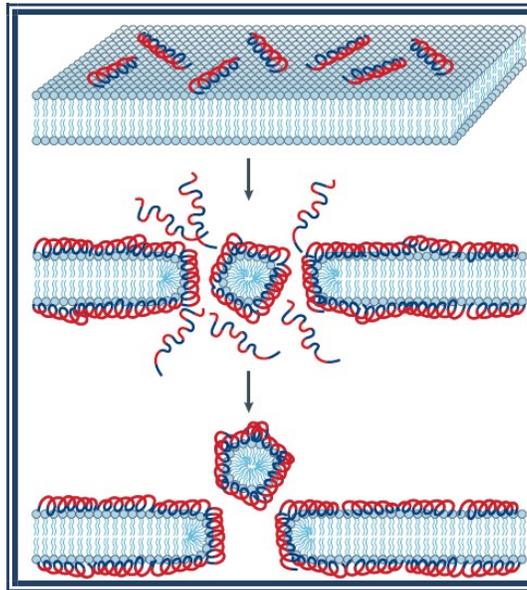


Figura 3. Modelo de alfombra: Las regiones hidrofílicas del péptido se muestran de color rojo, las regiones hidrofóbicas del péptido se muestran de color azul (Brogden, 2005).

Electroporación molecular.

Las altas concentraciones de aminoácidos catiónicos en algunos péptidos, les permiten formar un campo eléctrico afuera de la membrana. Con esta densidad de carga alcanzada, generan un potencial electrostático a través de la bicapa que es suficiente para perforarla. (Chan y col., 2006; Miteva y col., 1999).

Balsas lipídicas que se hunden.

Los péptidos anfipáticos pueden causar una pérdida del balance por unión y deformación (hundimiento) de las balsas lipídicas en la bicapa lipídica, formándose poros transitorios, los cuales son letales para microorganismos (Miteva y col., 1999; Pokorny y Almeida 2004).

De acuerdo con el efecto que ejercen sobre las membranas de patógenos, los AMPs se clasifican en permeabilizadores (los que hacen poros) y no permeabilizadores. Los péptidos no permeabilizadores presentan diferentes mecanismos antibacterianos, como la inhibición de procesos metabólicos, entre los que se encuentran: la inhibición de síntesis de DNA el cual se lleva a cabo por la

Marco Contextual

inhibición de síntesis de proteínas y la inducción de la degradación de algunas proteínas que son requeridas para la replicación del DNA (Boman y col., 1993; Dagan y col., 2002), un ejemplo de esta actividad la tiene la proteína rica en prolina PR-39. Se conocen otros AMPs que pueden inhibir la síntesis de DNA, como la buforina II, el HNP1 que reduce la síntesis de proteínas, DNA, RNA y además puede inhibir la síntesis de β -galactosidasa periplásmica (Brogden, 2005).

Algunos AMPs, como la buforina II, atraviesan la membrana citoplasmática directamente, sin la formación de poro, y se transloca al citoplasma en donde se acumula (Park y col., 2000), una vez ahí, los péptidos pueden alterar la membrana citoplasmática por medio de la formación de septos, provocando la inhibición de síntesis de la pared celular, de ácidos nucleicos, de proteínas o inclusive de la actividad enzimática. En algunos casos se ha observado que los AMPs pueden provocar un aumento de la producción de factores de virulencia de bacterias como el ácido hialurónico del polisacárido capsular (Gryllos y col., 2008). Se ha demostrado que las catelicidinas y defensinas pueden inactivar LPS al unirse de manera específica a éstos por medio de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas (Bals, 2000).

La pirocidina penetra en la célula blanco y puede unirse a DnaK, una proteína de choque térmico que participa en el plegamiento de proteínas, específicamente este péptido inhibe la actividad de ATPasa que presenta la DnaK, impidiendo el plegamiento de proteínas, y provocando una acumulación de estas especies no funcionales y en consecuencia la muerte bacteriana (Kragol y col., 2001; Otovos y col., 2000).

ANTECEDENTES.

En las últimas décadas, ha habido diversos reportes de la producción de péptidos antimicrobianos con sistemas biológicos de expresión, por ejemplo, la producción cecropina tanto en *Escherichia coli* como en el sistema de expresión de baculovirus (Callaway y col.,1993; Anderson y col., 1991), la producción de magainina en eritrocitos de ratones transgénicos (Sharma y col.,1994) o en *E. coli* (Lee y col.,1998a), moricina en *E. coli* (Hara y Yamakawa, 1996), y las defensinas humanas en *E. coli* (Xu y col.,2005). Sin embargo, la mayoría de estos sistemas tienen sus limitaciones, tales como los bajos rendimientos (Anderson y col., 1991; Callaway y col., 1993; Hara y Yamakawa, 1996) o la proteólisis de la proteína de fusión (Piers y col., 1993). Existen péptidos antimicrobianos, que desestabilizan los fosfolípidos de la membrana bacteriana (Ulvatne y col.,2001, 2004); por lo que, no es posible expresarlos directamente en *E. coli*.

Aunque es difícil expresar péptidos catiónicos por la letalidad de sus cargas para la célula hospedera, se han hecho reportes de la exitosa expresión de híbridos recombinantes como el péptido cecropina A (1-8) magainina 2 (1-12) en *Pichia pastoris* (Fengliang y col.,2006) y concatémeros como la buforina II en *E. coli*, evitando su letalidad mediante el uso de una proteína recombinante para enmascarar la actividad antimicrobiana intrínseca del péptido. (Lee y col., 1998b).

En estas estrategias, es frecuente que las proteínas expresadas se acumulen en el citoplasma formando cuerpos de inclusión (Pimienta y col., 2002), inhibiendo su actividad, dificultando su purificación y en consecuencia provocando bajos rendimientos (Anné y col., 2012).

El diseño de un buen sistema de expresión tiene un impacto importante en la sobre-producción de AMPs a bajo costo. Por tanto, con el objetivo de proponer una solución a las dificultades en la expresión heteróloga de AMPs, en este trabajo se propone el uso de bacterias Gram positivas como modelo de expresión. Este tipo de bacterias carecen de espacio periplásmico, por lo que secretan al medio las

Antecedentes

proteínas producidas, facilitando su plegado y correcta actividad, así como su purificación y evitando la acumulación intracelular que provoca la toxicidad sobre el hospedero (Anné y col., 2012).

Los *Streptomyces* son bacterias Gram-positivas en las que la mayoría de las proteínas se translocan a través de la membrana citoplasmática mediante el proceso Sec, una característica de este mecanismo es que las proteínas se sintetizan en el citoplasma con un péptido señal removible y se secretan en conformación extendida. Las peptidasas señales cortan el péptido señal ligado antes de su translocación, logrando que solo la parte madura sea secretada al ambiente extracelular. La secreción de los productos sobre-expresados confiere ventajas pues la proteína de interés se pliega, por lo que los rendimientos alcanzados en bacterias Gram-positivas son, mayores que en Gram-negativas. Además, la purificación se logra con menor riesgo de contaminación (ya sea por endotoxinas o por material genético de la célula huésped) (Anné y col., 2012)

Del grupo de los *Streptomyces*, *Streptomyces lividans*, es el hospedero de elección para la secreción de proteínas heterólogas. Las características que lo hacen interesante son: que cuenta con un sistema limitado de modificación-restricción que evita el uso de ADN no metilado para la transformación o conjugación, además, su baja actividad proteasa endógena previene la degradación del producto (Nakashima y col., 2005).

El género *Streptomyces* pertenece al orden *Actinomycetales*, los cuales fueron considerados por mucho tiempo un grupo inusual de hongos. Análisis químicos, de microscopía electrónica y actualmente moleculares y filogenéticos, han revelado que son realmente bacterias gram-positivas procariotas (Chater, 1993).

Durante su crecimiento, los estreptomicetos no sólo adaptan su morfología celular diferenciada, sino también experimentan cambios dramáticos en el metabolismo celular. Por ello, la diferenciación celular y sus mecanismos regulatorios se han

Antecedentes

convertido en un tema de investigación en progreso (Thompson y col., 2002). Los *Streptomyces* también secretan enzimas proteolíticas e inhibidores enzimáticos en grandes cantidades al medio extracelular (Gilbert y col., 1995). Además de que su ADN, tiene un alto contenido de G+C de (72.12% en el caso de *Streptomyces coelicolor*) (Bentley y col., 2002). Una característica muy importante es que cuentan con un mecanismo muy especializado de translocación de proteínas, pueden ser translocadas hacia o a través de la membrana citoplasmática, mediante una ruta de translocación dependiente de una extensión en su extremo amino denominada péptido señal. Además de esta ruta de secreción se ha descrito otro proceso de translocación activa, denominado proceso tipo I o de cassette de unión a ATP (ABC, por sus siglas en inglés, ATP-binding cassette-pathway). En las bacterias gram-negativas, las proteínas se pueden insertar o pasar a través de la membrana interna y ser liberadas en el periplasma a través de las rutas de translocación dependientes de péptido señal. En los sistemas de secreción tipo II y tipo VI, el tránsito a través de la membrana externa ocurre por la formación de un poro por determinadas proteínas de membrana interna y externa (tipo II) o por la región carboxilo terminal del sustrato (tipo VI). La secreción tipo II es el proceso principal para la secreción de proteínas extracelulares por la bacteria (Pugsley y col., 2004).

En bacterias, la mayoría de las proteínas son translocadas a través de la membrana citoplasmática mediante el proceso II, del cual sólo se han informado dos tipos: el proceso Sec y el proceso de translocación "twin-arginine" (Tat). La característica fundamental de las proteínas transportadas a través del proceso II es que son sintetizadas en el citoplasma con un péptido señal removible unido a su extremo amino. Este péptido contiene un sitio de corte para una peptidasa específica (Ala-Xxx-Ala ↓) que corta durante o momentos antes de su translocación. Aunque las secuencias primarias rara vez se conservan entre péptidos señal, todos tienen una estructura tripartita típica: un amino-terminal

Antecedentes

básico, un núcleo central apolar y una región carboxi-terminal que contiene el sitio de reconocimiento de peptidasa de señal (Lammertyn y col., 1998).

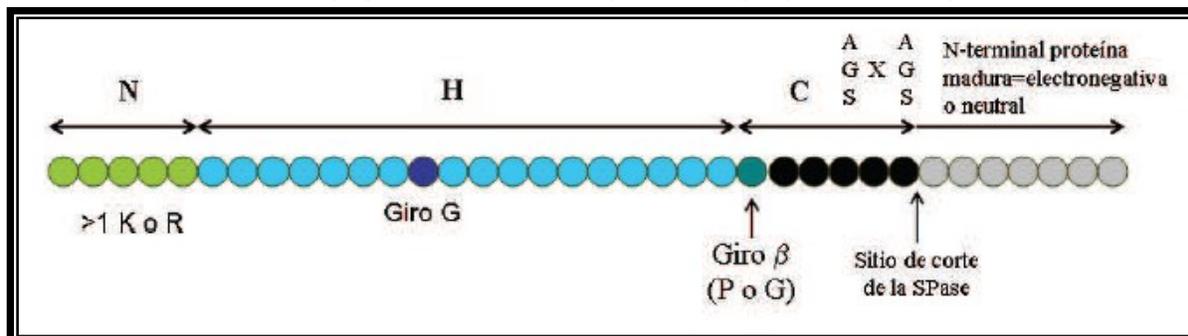


Figura 4. Representación Esquemática de un péptido señal. El dominio N tiene generalmente una carga neta positiva debido a la presencia de varios residuos de aminoácidos (Lys o Arg). El dominio H constituye el centro hidrofóbico del péptido señal y es la parte más importante requerida para la localización e inserción de la pre-proteína en la membrana. Frecuentemente, un residuo interruptor de hélices (Gly o Pro) se encuentra en el medio de la región H, lo cual permite al péptido señal formar una estructura tipo horquilla que se puede insertar en la bicapa lipídica. El dominio C incluye el sitio de corte de la peptidasa señal (SPase) y es la única región del péptido señal que demanda cierta especificidad de la estructura primaria; es decir, la secuencia de aminoácidos. Los residuos en las posiciones -3 y -1, relativos a la proteína madura, generalmente son residuos pequeños y neutros como: Ala, Gly y Ser, con una fuerte preferencia por Ala (Ala-X-Ala).

Los péptidos señales de *Streptomyces* tienen un promedio de 35.5 ± 7.9 aminoácidos, mientras la longitud promedio de los péptidos señales de otras bacterias gram-positivas es 29.2 ± 5.6 y los de las bacterias gram-negativas es 23.6 ± 3.4 aminoácidos. La mayoría de las proteínas transportadas a través de la membrana interna de las bacterias gram-negativas son translocadas a través del proceso Sec. La característica distintiva del aparato Sec es que las proteínas son secretadas en una conformación extendida y se unen frecuentemente a chaperonas (Edman y col., 1999).

Las peptidasas señales (SPasas) cortan los péptidos señales de las proteínas pre-secretadas durante o momentos antes de su translocación. Solamente después, la parte madura de la proteína secretada puede ser liberada al ambiente extracelular (Dalbey y col., 1997). En todas las bacterias estudiadas, este tipo de SPasas (tipo

Antecedentes

I) son esenciales para la viabilidad celular. La eliminación de las SPasas conlleva a la acumulación de proteínas precursoras en la membrana citoplasmática y posteriormente, a la muerte celular (Koshland y col.,1982; Dalbey y col.,1985).

Un caso especial es *Streptomyces lividans* TK24, ya que ha sido extensamente utilizada como hospedadora debido a que posee relativamente baja actividad de proteasas extracelulares, las cuales pueden afectar la integridad y los rendimientos de las proteínas producidas (Gilbert y col.,1995; Binnie y col.,1997). El ejemplo más sobresaliente ha sido la obtención del factor α de necrosis tumoral murino (mTNF α) a niveles de 300 mg L⁻¹ a partir del sobrenadante de cultivo, cuando se utilizaron las señales reguladoras y de secreción del inhibidor de subtilisina de *Streptomyces venezuelae* CBS762.70 (Vsi) (Lammertyn y col., 1997). Este resultado sugiere que las señales reguladoras y de secreción del *vsí* pueden ser eficientes en dirigir la expresión y translocación de otras proteínas heterólogas en *Streptomyces lividans* TK24. Además, *Streptomyces lividans* contiene al menos cuatro SPasas tipo I: Sip W, X, Y, Z (Schacht y col.,1998; Parro y col., 1998; Parro y col., 1999). Se ha demostrado que las preproteínas no se unen a una SPasa en particular, lo que sugiere que las SPasas de *S. lividans* compiten por ellas y parece no haber ninguna correlación entre la afinidad de unión a una SPasa y la eficiencia de procesamiento de la preproteína, lo que podría resultar en un aumento de la secreción de una proteína en particular (Geukens y col., 2004).

Cuando se ha utilizado a *Streptomyces lividans* para la producción de proteínas recombinantes, la estrategia ha sido fusionar el gen de interés a la secuencia señal de una proteína homóloga abundantemente secretada a través de la vía de secreción Sec (Gilbert y col.,1995; Binnie y col.,1997).

JUSTIFICACIÓN.

El combate a los microorganismos fitopatógenos requiere del uso continuo de productos químicos, lo que genera cepas resistentes y repercusiones negativas tanto en la salud humana como en el medio ambiente (ya que son de difícil remoción) (Agrios., 1988); estas son las principales razones por las cuales es necesario desarrollar nuevas alternativas que sustituyan estos químicos disminuyendo sus efectos negativos. En este sentido, los AMPs son una alternativa prometedora, ya que al ser esenciales en la respuesta inmune innata, pueden ejercer su efecto antimicrobiano en una amplia gama de microorganismos, actuando sobre sus membranas y causando estrés múltiple a través de diversos blancos (Marcos y col., 2008), y a pesar de ser muy activos en las membranas de procariontes, presentan menor capacidad para romper las membranas de eucariontes, debido a la ausencia de lípidos cargados negativamente en su superficie, la falta de un gradiente de potencial de membrana fuerte y la presencia de colesterol (Hancock y Lehrer 1998; Peschel y Sahl 2006; Yeaman Yount 2003). Gracias a esto presentan cierto grado de selectividad, y son menos susceptibles a crear resistencia. Por lo anterior podemos suponer que usarse de forma directa sobre los fitopatógenos, ejercerán su acción sobre estos y sin afectar los cultivos, cuyas membranas celulares presentan características lipídicas diferentes (sin cargas en la superficie) (Breukink y Kruijff 2006).

Los péptidos antimicrobianos se pueden obtener directamente de fuentes naturales, mediante la hidrólisis de proteínas de mayor tamaño o por síntesis química, pero estos métodos no son rentables. Un sistema de expresión biológica mediante técnicas genéticas basadas en una tecnología de fusión sería un método más eficiente para la producción de estos péptidos. Sin embargo, es difícil expresar péptidos antibacterianos catiónicos por ingeniería genética en bacterias, ya que son altamente tóxicos para la célula hospedera, además de ser sensibles a la degradación por proteasas intracelulares. Una solución a este problema es la

Justificación

producción heteróloga, con el diseño de un sistema de producción seguro para la célula hospedera.

Como se menciona en los antecedentes, en las últimas décadas, ha habido diversos reportes de la producción de péptidos antimicrobianos con sistemas biológicos de expresión en *E. coli*, en su mayoría híbridos recombinantes (Fengliang y col.,2006), evitando con esto su letalidad mediante el uso de una proteína para enmascarar la actividad antimicrobiana del péptido (Lee y col., 1998b). En todos ellos se han obtenido bajos rendimientos (Anderson y col., 1991; Callaway y col., 1993; Hara y Yamakawa, 1996) o la proteólisis de la proteína de fusión (Piers y col., 1993). También se sabe que no ha sido posible expresar un péptido antimicrobiano directamente en *E. coli* por la letalidad de sus cargas para la célula hospedera.

Considerando lo anterior, el método adecuado para la sobreproducción de AMPs, evitará pérdidas económicas, también biológicas, a costos reducidos. Por lo que, la contribución de este proyecto no se limita a reducir o controlar un problema mundial (el control de fitopatógenos), sino que abarca otros sectores como: médico, agrícola, alimenticio, ganadero, etc. Se cree también que es importante hacer uso de los sistemas naturales de defensa, puesto que esto disminuye el riesgo de generar organismos resistentes. En este sentido se contribuye en la reducción de los efectos adversos que este tipo de patógenos produce al medio ambiente.

Una vez analizadas diferentes alternativas de sistemas de expresión, con el objetivo de encontrar aquella en la que se logre una buena expresión del péptido de interés, se plantearon tres estrategias para la sobreexpresión de un CAP en un sistema de producción heterólogo. Dos de ellas fueron desarrolladas para la expresión en *Escherichia coli* BL21 (DE3) *pLysS* y la tercera es un sistema para *Streptomyces lividans* TK24.

Hipótesis y Objetivos

HIPÓTESIS

Es posible producir de manera heteróloga un péptido con actividad antimicrobiana, sobre microorganismos fitopatógenos.

OBJETIVOS

Objetivo General.

Seleccionar mediante modelado *in silico* un péptido con actividad antimicrobiana y expresar el gen sintético en *Escherichia coli* y/o *Streptomyces lividans* para evaluar su actividad tóxica sobre diferentes fitopatógenos.

Objetivos Específicos

- ❖ Seleccionar *in silico* el péptido con actividad antimicrobiana.
- ❖ Diseñar el *casette* de expresión.
- ❖ Clonar el gen sintético en el vector pET17-b y/o en pIJ486.
- ❖ Confirmar la correcta construcción del *casette* de expresión obtenido.
- ❖ Obtener transformantes de *Escherichia coli* BL21 (DE3) *pLysS* con el plásmido pET17B-pep y/o de *Streptomyces lividans* TK24 con pIJ486.
- ❖ Confirmar la identidad de las transformantes obtenidas.
- ❖ Realizar cinéticas de producción del péptido.
- ❖ Realizar pruebas de actividad *in vitro* del péptido producido contra diferentes microorganismos fitopatógenos.

METODOLOGÍA

Para el desarrollo de este proyecto, se propusieron tres metodologías diferentes con distintos sistemas de expresión.

El primer sistema de expresión es para células de *Escherichia coli* BL21(DE₃) pLysS, en el cual se utilizó el plásmido pET17-b como vector de expresión, este plásmido cuenta con un promotor fuerte, el promotor de la polimerasa del fago T7, mientras que *Escherichia coli* BL21(DE₃) pLysS, cuenta con el gen que codifica para **esta polimerasa**, lo que asegura que el gen de interés se expresará hasta un 50% más de lo esperado. Este sistema mantiene un control estricto de la expresión de las proteínas, evitando que exista expresión basal, por lo que es usado en la expresión de proteínas potencialmente tóxicas (como es el caso del péptido propuesto). Asimismo, el plásmido contiene un gen de resistencia a ampicilina y *Escherichia coli* BL21(DE₃) pLysS contiene un gen de resistencia a cloranfenicol (CM), lo que proporciona un sistema de selección rápido y sencillo. El sistema para *Escherichia coli* BL21(DE₃) pLysS, también incluye un gen que codifica para la expresión de una pequeña cantidad de lisozima T7, un inhibidor natural de la RNA polimerasa T7, que ayuda a controlar su expresión basal. Todo esto asegura que la transcripción del gen de interés no se lleve a cabo hasta que se realice una inducción con un análogo de lactosa como el isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), controlando así el momento de la expresión (pudiendo mantener reprimida la transcripción del péptido hasta que el crecimiento celular sea adecuado) (Novagen 2003).

En la segunda estrategia se utilizó el sistema de expresión mencionado anteriormente, pero realizando una modificación sobre el péptido catiónico, que permite la inhibición de sus cargas por cercanía a un complementario. Entre ambos péptidos se agregó una serie de aminoácidos que funcionan como una bisagra (brindando libertad de movimiento a ambos péptidos). Cuando la bacteria traduzca este fragmento, la atracción entre ambos péptidos será tan fuerte que se unirán

inactivado sus cargas, lo que impedirá la formación de poros en la membrana, ya que la actividad del péptido, está dada precisamente por las cargas. En consecuencia, la célula hospedera incrementará la producción de esta construcción, que podrá recuperarse al lisar la célula, finalmente la re-activación del péptido de interés se realizará por acción de una peptidasa (hidrólisis específica sobre el punto de unión de ambos péptidos).

En la última estrategia se diseñó un sistema de expresión para *Streptomyces lividans* TK24, ya que es considerado un organismo no patógeno a humanos (nivel de contención 1) (Kieser y col., 2000), además de secretar bajas cantidades de proteasas extracelulares, las cuales pueden afectar los rendimientos del péptido de interés, este sistema de expresión se diseñó fusionando un péptido señal al péptido de interés, lo que constituye una unidad de translocación única, y que ha sido usado como herramienta molecular para optimizar los rendimientos de las proteínas secretadas, evitando con esto la toxicidad a la célula hospedera. El sistema utiliza como plásmido de clonación, el vector pIJ486 que contiene un gen de resistencia a tioestrepton.

Es importante mencionar que estas tres estrategias se realizaron en paralelo, buscando que cualquiera de ellas que se concluyera y brindará resultados, cumplirá los objetivos plateados. El diagrama de la fig. 5 muestra el desarrollo de cada una de estas propuestas.

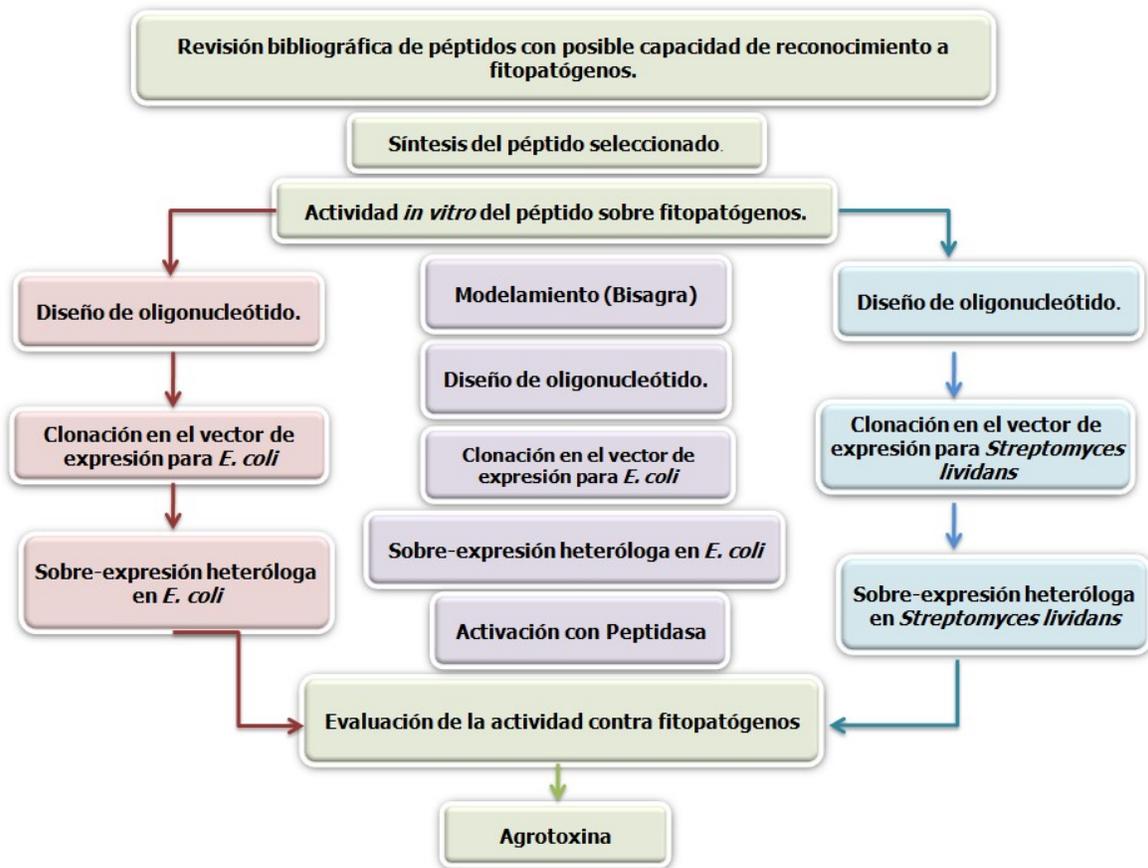


Figura 5. Diagrama de la estrategia a seguir.

El primer paso para el desarrollo del trabajo fue la elección del péptido que se deseaba expresar.

Análisis in silico de péptidos con posible actividad antimicrobiana.

Después de revisar en la literatura las características de diferentes péptidos con posible actividad antimicrobiana contra fitopatógenos, se delimitaron varios criterios de selección:

- 1.- Péptidos cortos (facilitando su expresión y estabilidad).
- 2.- Péptidos que sean catiónicos (se les atribuye mayor actividad antimicrobiana).
- 3.- No patentados o patente vencida.

4.- Que existan antecedentes acerca de su nula toxicidad en plantas y animales (no deben ser tóxicos para ninguno de los dos).

Fitopatógenos.

Material biológico.

Uno de los objetivos del trabajo es medir la actividad del péptido de interés, sobre diferentes fitopatógenos para lo cual, las cepas de trabajo fueron proporcionadas por Química Agronómica de México, S. de R.L. M.I., una empresa mexicana dedicada a la prevención y contención de enfermedades bacterianas en cultivos agrícolas <http://www.qam.com.mx>.

Tabla 1. Fitopatógenos probados

No	MICROORGANISMO
1.	<i>Bacillus subtilis</i>
2.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
3.	<i>Pseudomonas liliis</i>
4.	<i>Ralstonia solanacearum</i>
5.	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>
6.	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>

Características de las cepas de clonación.

Escherichia coli BL21(DE3)pLysS

Esta cepa (*E. coli* B F⁻ *dcm ompT hsdS* (r_B⁻ m_B⁻) *gal* λ(DE₃) [*pLysS* Cam^r]), ejerce un control estricto de la expresión de la proteína, lo que ayuda a la expresión de proteínas tóxicas, además de ser resistentes al cloranfenicol. Tienen el lisógeno del fago λ DE3 que expresa el gen de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor *lacUV5*, cuando se induce con IPTG. Los plásmidos *pLysS* expresan constitutivamente niveles bajos de lisozima T7 que inhibe los niveles basales de la RNA polimerasa de T7 y de este modo, reduce el nivel basal de expresión del gen clonado. Otras características importantes de esta cepa son la deficiencia en la proteasa dependiente de la ATPasa Lon, que disminuye la degradación de la proteína recombinante expresada en la bacteria, y la ausencia del elemento *lacZΔM15*, requerido para el *test* de complementación α, además de ser la hospedadora más comúnmente utilizada en la producción a gran escala de proteínas recombinantes (Novagen 2003).

Escherichia coli BL21 (DE3) *pLysS*, se cultivó a 37°C con agitación de 250 rpm en medio líquido Luria-Bertani (LB) suplementado con 34 µg/ml de Cloranfenicol (CM).

***Streptomyces lividans* TK24**

Debido a las características de esta cepa (mencionadas en antecedentes) y a las grandes ventajas que representa en la expresión, decidimos hacer uso de este microorganismo como modelo de estudio cultivándolo en medio R2 suplementado con 50 µg/ml de tioestrepton a 30°C con agitación de 300 rpm durante 48 h.

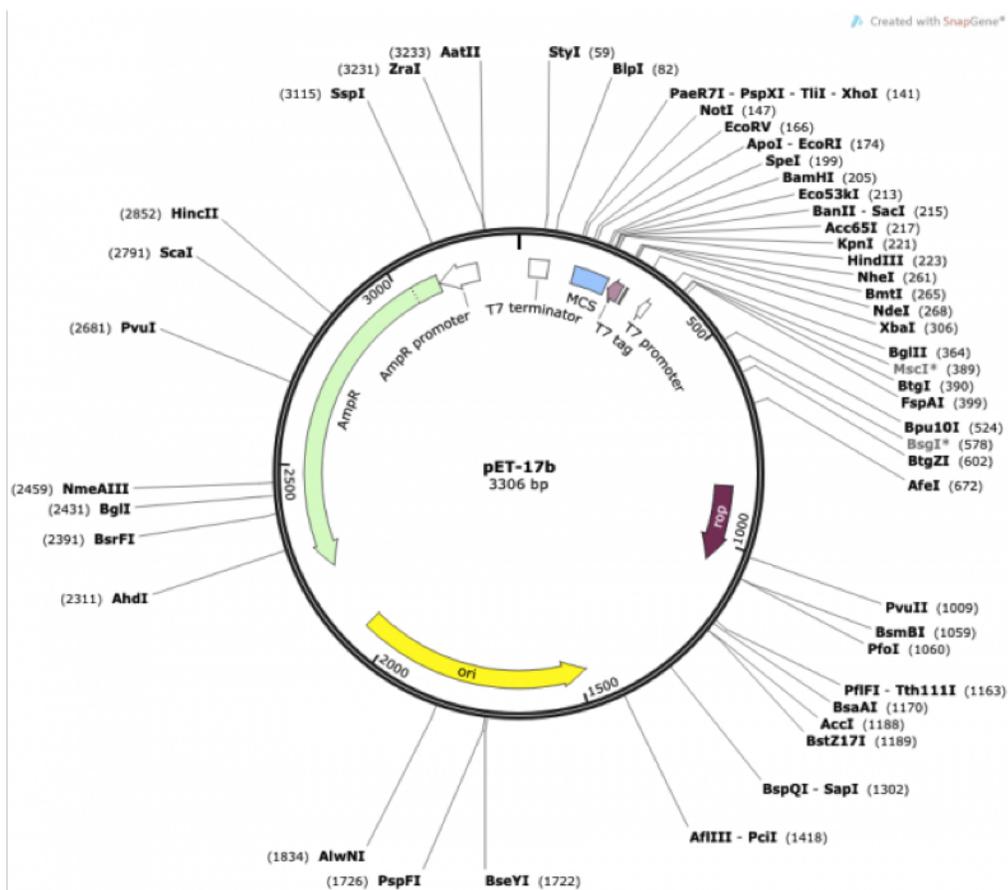
Plásmidos.

Vector pET17-b

Como vector de expresión para *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS se utilizó el plásmido **pET17-b** (Figura 7), un vector bacteriano para la expresión de proteínas N-terminales marcadas con T7. Este plásmido tiene un tamaño de 3.3 Kb y confiere resistencia frente al antibiótico ampicilina, además de poseer el promotor y terminador de la polimerasa T7.

Transfiriendo el plásmido a un huésped de expresión que contenga una copia cromosómica del gen de la T7 RNA polimerasa bajo el control de lacUV5, la expresión se puede inducir mediante la adición de IPTG al cultivo bacteriano (Novagen, 2003).

Figura 6. Mapa del plásmido de expresión pET17-b.



Vector pIJ486

El plásmido **pIJ486** (Fig. 8): Es un plásmido de expresión para *Streptomyces* de alto número de copias, que contiene un gen de resistencia al tioestrepton y con un tamaño de 6.2 Kb.

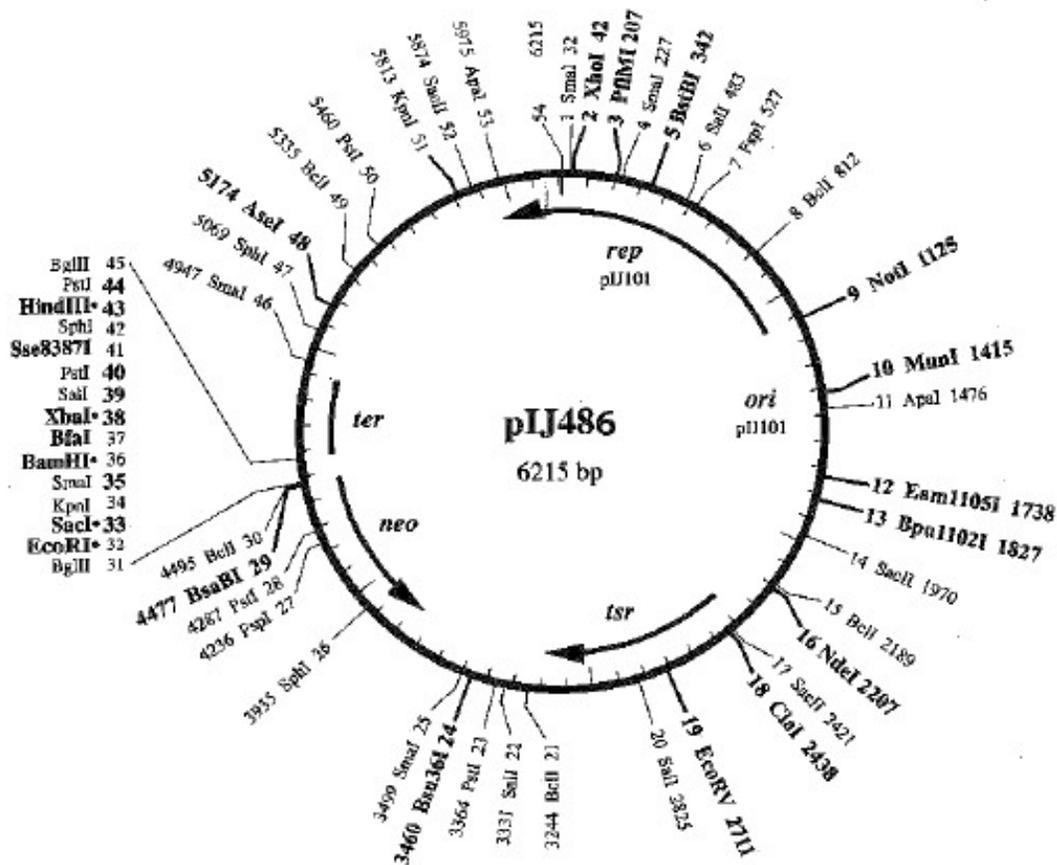


Figura 7. Mapa del plásmido de expresión pIJ486.

Tabla 2. Cepas y plasmidios usados en el proyecto

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE ₃) pLysS	(<i>Escherichia coli</i> B F ⁻ dcm ompT hsdS _{(r_B⁻ m_B⁻) gal λ(DE₃)[pLysS Cam^r])}	Novagen 2003
<i>Streptomyces lividans</i> TK24	str-6 SLP2- SLP3-	Kieser y col., 2000
Plásmido	Características	Referencia
pET17-b	Posee el promotor y terminador de la polimerasa T7, los genes que son clonados en este plásmido, se encuentran bajo un estricto control de la transcripción.	Novagen 2003
pIJ486	Vector derivado de pIJ10, difiere de pIJ487 sólo en la orientación del fragmento <i>Bgl</i> I que contiene los sitios de clonación	Kieser y col., 2000

Medios de cultivo.

Medio LB (1 litro)

NaCl, 5g; triptona, 10g; extracto de levadura, 5g; agua desionizada, 1L; pH 7.0 ±0.2. Para preparar medio sólido se adicionó agar bacteriológico a una concentración de 15 g/L.

Medio R₂ (1 litro)

Sacarosa, 103g; K₂SO₄, 0.25g; MgCl₂.6H₂O, 10.12g; Glucosa, 10 g; Casaminoácidos, 0.1 g; Extracto de levadura, 1 g; Lab Lemco poder, 5g. El medio se suplementó con CuSO₄.5H₂O (2mM-1/100) y CaCl₂.2H₂O 36.8% (1/100), antes de usarse.

Metodología

Medio YEME (1 litro)

Extracto de levadura, 3g; Bactopeptona, 5g; Extracto de malta, 3g; Glucosa, 10g; Sacarosa, 340g (34% final). Antes de esterilizar agregar 2 ml/L de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (2.5M), para una concentración final de 5 mM. Para preparar protoplastos agregar también 25 ml/L de glicina al 20%, para una concentración final de 0.5%.

Medio S

Peptona, 4g; Extracto de levadura, 4g; $Mg SO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5g; KH_2PO_4 , 2g. Adicionar con 50 ml de glucosa al 15% y 12.64 ml de glicina al 20%.

Regulador PTC (1 litro)

Sacarosa, 103 g; K_2SO_4 , 0.25 g; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 2.03 g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 2.94g; regulador TES (pH7.2, 0.25 M), 80ml; Solución de elementos traza, 2ml.

Solución de elementos traza (1 litro)

$ZnCl_2$, 40mg; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 200mg; $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 10mg; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 10mg; $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$, 10 mg; $(NH_4)_6 MO_7O_{24} \cdot 4H_2O$, 10 mg.

Medio Phage (1 litro)

$Mg SO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.74 g; Glucosa, 10g; triptona, 5g; Extracto de levadura, 5g; Lab Lemco poder, 5g. Ajustar pH a 7.2

Medio Undecil (1 litro)

Bactopeptona, 5g; Glicerol, 1%.

Medio AN (1 litro)

Extracto de carne, 1g; Extracto de levadura, 2g; Peptona, 5g y $NaCl_2$, 5g.

Actividad in vitro del péptido sobre fitopatógenos.

Después de sintetizar químicamente el péptido, se realizaron pruebas *in vitro* para evaluar la actividad antimicrobiana de éste. La determinación se realizó mediante bioensayos, utilizando diferentes concentraciones del péptido. El crecimiento se determinó midiendo la densidad óptica (DO) a 600 nm (Broekaert y col., 1990). Se utilizó medio líquido LB, como medio de cultivo para la bacteria (NaCl 5g; triptona, 10g; extracto de levadura, 5g; agua desionizada, 1L; pH 7,0 ±0,2). Para preparar medio sólido se adicionó agar bacteriológico a una concentración de 15 g/L. Se esterilizó en autoclave a 121 lb de presión durante 20 minutos (Miller, 1972). Las cajas se incubaron a 37°C. Los experimentos se realizaron por triplicado.

METODOLOGÍA PARA LA PRIMERA ESTRATEGIA

En esta estrategia, se trabajó en la sobreexpresión del péptido en *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS, por lo que se realizó el diseño del minigen que codifica para el péptido B15 (FKCRRWQWRMKKLGA), tomando en cuenta los codones de uso preferencial para este microorganismo, el minigen, se clonó en el vector pET17-b y se intentó sobre expresar en *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS.

Construcción del sistema de expresión para *Escherichia coli* (DE₃) pLysS.

El primer paso para esta estrategia fue como se ha mencionado, el diseño de los oligos que codifican para el minigen, los cuales se construyeron tomando en cuenta los codones de uso preferencial del microorganismo. Se sintetizaron por separado como "primers" complementarios que incluían sitios de corte para las enzimas de restricción Hind III y Bam H1. Con estas mismas enzimas se digirió el vector pET17-b, el cual se ligó al minigen utilizando una relación molecular de 1:3 vector: inserto (en un tubo se colocó el vector, el inserto (B15); DNA ligasa del fago T4 (1 unidad/μL), regulador de la ligasa concentrado (10x) y H₂O bidestilada; todo se mezcló y se incubó a 4°C toda la noche), esta construcción (pET17b-minigen) sirvió para transformar células de *Escherichia coli* DH5α por

electroporación, en las cuales se replicó la construcción para posteriormente obtener el ADN plasmídico por minipreparaciones.

Selección de transformantes.

La selección de las células transformadas de *Escherichia coli* DH5 α , se llevó a cabo en medio LB por enriquecimiento con ampicilina, que es un método rápido y efectivo para la selección. Una vez crecidas las transformantes es necesario escoger aquellas que contengan el plásmido ligado al inserto y debido a que nuestro plásmido contiene un gen (*amp^R*) que codifica la resistencia al antibiótico ampicilina. La bacteria hospedera no podrá crecer en el medio de prueba que fue suplementado con ampicilina (100 μ g/mL) a menos que el vector haya transferido el gen de resistencia (Sambrook y col., 1989). Aunque también puede ocurrir que en el medio crezcan cepas que contengan el vector sin inserto.

Transformación de *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS

La construcción pET17b-minigen se obtuvo a través de mini preparaciones y con esta se transformaron células de *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS por electroporación. El voltaje utilizado en la electroporación fue de 1100 volts. Las cubetas del electroporador y las células se mantienen a -20°C antes de iniciar y en hielo durante el proceso. A 50 μ l de células electrocompetentes de *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS se les agregó la construcción (pET17b-minigen). La transformación se llevó a cabo colocando la mezcla en una cubeta de electroporación y aplicando la descarga, inmediatamente después se agregó medio líquido y se incubó durante hora y media a 37°C con agitación a 200 rpm para que las células se recuperarán. Durante el periodo de incubación se prepararon cajas con agar LB, para seleccionar las transformantes de *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS por adición al medio de los antibióticos apropiados (Sambrook y col., 1989).

Sobre-expresión heteróloga e Inducción en *Escherichia coli*.

La sobre-expresión se llevó a cabo en el sistema de expresión pET17-b con células de *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS, dicho sistema es inducible por medio de

IPTG. La inducción se realizó sobre las células transformadas. Estas se precultivaron en medio LB líquido suplementado con antibiótico a 37°C, toda la noche. Del precultivo, se tomó una alícuota para inocular 200 ml de medio LB líquido suplementado con antibiótico. Después de la inoculación el medio se incubó a 37°C y se monitoreo la densidad óptica cada media hora hasta alcanzar un valor de 0.8. Una vez alcanzada la densidad óptica necesaria, se agregó la cantidad necesaria de IPTG para alcanzar una concentración final de 1 mM. El cultivo se incubó durante 4 horas. Posteriormente se cosechó la biomasa a 5000 rpm durante 10 min a 4°C, se lavó el "pellet" con H₂O fría y se resuspendió almacenándose a una temperatura de -80°C (con el fin de lisar las células), al día siguiente los tubos se descongelaron a temperatura ambiente y se les colocó la misma cantidad de perlas de vidrio se agitaron vigorosamente durante 1 min y se colocaron 2 min en nitrógeno líquido (5 veces), por último se centrifugaron las perlas a 5000 rpm durante 5 min a 4°C y el sobrenadante se conservó a -20 °C hasta su uso (no más de 5 días) (Novagen, 2003).

Pruebas de Actividad.

Con el sobrenadante y el lisado celular, se realizaron diferentes bioensayos de difusión para comprobar la producción del péptido. El primer ensayo fue desarrollado con el método de difusión en pozo, que es una técnica adecuada para las suspensiones acuosas que no son esterilizadas por filtración, en este método la presencia de partículas suspendidas en la muestra tiene poca probabilidad de interferir con la difusión de las sustancias antibacterianas al agar. La precipitación de sustancias insolubles en los cilindros, previene cualquier difusión de microorganismos al agar evitando así la contaminación. Para el ensayo por pozos, se prepararon cajas con medio LB, que fueron inoculadas con suspensión bacteriana de alguno de los fitopatógenos, esparciéndola con ayuda de una varilla acodada para obtener una dispersión uniforme en toda la superficie. El inóculo se deja secar, para posteriormente perforar los pozos con ayuda de un sacabocado estéril, en cada uno de los pozos se colocaron 100 µl del sobrenadante a diferentes

tiempos de crecimiento, un control positivo (péptido 48 μ mol/mL) y un control negativo (medio líquido), se incubaron las cajas de 24-48 horas para que el sobrenadante difundiera por el agar (Berghe Y Vlietinck 1991)

También se realizaron ensayos de difusión por discos, en los cuales las cajas se prepararon de la misma manera, sólo que los discos fueron impregnados con 50 μ l de sobrenadante, como control positivo 50 μ l del péptido a una concentración de 48 μ mol/mL y como control negativo 50 μ l de agua estéril. Los discos se colocaron sobre la superficie de las cajas con ayuda de pinzas estériles y oprimiendo suavemente para asegurar un buen contacto con el medio de cultivo. Como la difusión es casi instantánea, no se deben reubicar los discos después de haberlos depositado en la superficie del agar. Además, deben ser espaciados de manera que su distancia a la pared de la placa fuese de 15 mm y entre ellos de 30 mm aproximadamente, posteriormente se incubaron a 37°C por 24 horas (Bauer y col., 1966; Erna 2002).

METODOLOGÍA PARA LA SEGUNDA ESTRATEGIA

Diseño del modelo de bisagra

Para nuestra segunda aproximación experimental (el modelo de inactivación por bisagra), lo primero que se hizo, fue la búsqueda de homólogos del péptido B15 en Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), esto con la finalidad de encontrar una secuencia de aminoácidos que permitiera establecer la forma deseada a la bisagra y a partir de su secuencia se desarrollaron varios modelajes que incluyen las siguientes partes: un péptido complementario, un bucle (bisagra) y el péptido B15.



Figura 8. Secuencia de aminoácidos para el modelo de bisagra.

En la construcción del modelo se tomaron en cuenta la carga estequiométrica y el tamaño de los aminoácidos (restricciones estéricas). Como se puede apreciar en la figura anterior la bisagra se encuentra constituida básicamente por dos aminoácidos largos con carga y dos aminoácidos cortos sin carga, divididos por un aminoácido hidrofóbico pequeño, esto con el fin de que las cadenas laterales no interfirieran con su cercanía y a la vez para brindar libertad de movimiento y flexibilidad, ya que la intención es que ambos péptidos se atraigan de tal manera que ambas cadenas queden tan cercanas que las cargas del péptido catiónico (B15) se inactiven por interacción con las cargas de su complementario aniónico.

Modelamientos de la bisagra

Una vez que se encontró la secuencia de aminoácidos que podría funcionar como bisagra, era necesario encontrar todos y cada uno de los aminoácidos que conformarían el péptido complementario y que ayudarían a soportar la estructura de bisagra, así que estos aminoácidos, se fueron escogiendo uno a uno, hasta encontrar la secuencia adecuada a las necesidades del proyecto.

Cada secuencia realizada se envió a un servidor que se encarga de predecir la estructura y posible función de las proteínas (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), se realizaron cerca de 150 modelos de los cuales se obtuvieron los archivos pdb, con los cuales se pueden realizar simulaciones, en programas de modelamiento como Swiss PdbViewer,

modeller o VMD. Con estos programas se modelaron diferentes estructuras del péptido bisagra, en las cuales se tomaron en cuenta diferentes parámetros, como la estructura conformacional del modelo, la tensión que generaban cada uno de los aminoácidos que forman la estructura, la medida de confiabilidad del modelo enviado después de hacer comparaciones en la base de datos de I-TASSER y la simulación que se realizó del modelo en caja de agua. Al final la elección se orientó a elegir un modelo con una C-score cercana a 2 y alto grado de confiabilidad.

Simulación del modelo de bisagra en caja de agua.

Con el modelo de elección, se realizaron algunas simulaciones del péptido en caja de agua por un lapso de 100 ns a una temperatura de 298 °K, con 1 atm de presión, 0.1 M de CaCl₂ y bajo condiciones periódicas a la frontera (PBC). Haciendo uso del programa NAMD2.7b2 con 32 procesadores en paralelo en el Centro Nacional de Súper computo (Camino a la Presa San José 2055. Col. Lomas 4 sección CP. 78216. San Luis Potosí S.L.P. Tel: (444) 834 20 00).

METODOLOGÍA PARA LA TERCERA ESTRATEGIA

El primer paso para esta metodología fue diseñar el *Casette* de expresión para *Streptomyces lividans* Tk24, para lo cual se tuvieron que tomar en cuenta algunas consideraciones:

Se hizo uso de los codones preferenciales para este microorganismo, debido a que los estreptomicetos tienen un genoma con alto contenido de GC, el uso de codones puede influir en el nivel de traducción de un gen heterólogo con menor contenido de GC (Wright y Bibb 1992). También se tomó en cuenta el vector de expresión, debido a que los vectores de clonación en *Streptomyces* pueden dividirse en dos clases: los plasmidios replicativos y los integrativos. Vectores de bajo número de copias por célula, basados en el replicón SLP1.2, así como derivados del plasmidio pIJ101, de alto número de copias, ambos se han utilizado

en la clonación de genes y *cassettes* de expresión-secreción. En nuestro caso elegimos un vector derivado de pIJ101, para expresar un alto número de copias (vector pIJ486). También sabíamos que el promotor *vsi* de *Streptomyces venezuelae* ha presentado una capacidad de inicio de la transcripción 1.5 y 1.9 veces mayor que los promotores *aph* y *ermEp*, respectivamente (Van Mellaert y col., 1998), por lo que decidimos incluirlo en el *cassette* de expresión

La fusión de un péptido señal a una proteína constituye una unidad de translocación única que ha sido utilizada como herramienta molecular para optimizar los rendimientos de las proteínas secretadas. Por lo que nos dimos a la búsqueda de un péptido señal reportado con amplio grado de secreción. En este sentido, existen reportes que han comprobado mayores rendimientos de mTNF α cuando el gen *mtnf α* se fusiona a la secuencia señal de *vsi* (*vsi-ss*), utilizando las señales reguladoras y de secreción del inhibidor de subtilisina de *Streptomyces venezuelae* CBS762.70 (Vsi) (300 mg l⁻¹) que cuando fue fusionado a la secuencia señal de la α -amilasa (1-10 mg l⁻¹), manteniendo el mismo promotor y las otras regiones reguladoras intactas (Lammertyn y col., 1997; Lammertyn y col., 1998). Posteriormente, el mTNF α fue secretado entre 200 y 300 mg l⁻¹ al medio de cultivo cuando la cepa recombinante fue crecida en el caldo TSB (Pozidis y col., 2001).

El alto contenido de GC del genoma de *Streptomyces* tiene efectos sobre la composición de la región N de los péptidos señal. Debido a que los codones que codifican para Arg son más ricos en GC que los de Lys. Arg es usada preferentemente en los péptidos señales de *Streptomyces*, los cuales tienen una carga neta promedio de +3.5. Este valor es mayor que el de los péptidos señales de las bacterias grampositivas (+2.9) o de los de *Escherichia coli* (+2) (von Heijne y Abrahmsen 1989).

Para la construcción del *cassette* de expresión, se consideraron, el uso de codones preferenciales, debido a que los estreptomicetos tienen un genoma con alto contenido de GC, el uso de codones se caracteriza por el uso preferencial de estos

dos nucleótidos en la tercera posición (Wright y Bibb 1992), lo que influye a nivel traduccional en un gen heterólogo con menor contenido de estos.

Ciertos codones pueden afectar la expresión, debido a que no existe un ARNt apropiado para ellos, tal es el caso del codón TTA para leucina, que es raramente usado por *Streptomyces* en etapas tempranas de crecimiento, por lo que decidimos usar CTG en estos casos, mejorando con ello la traducción (Ueda y col 1993). Otra consideración fue el cambio de promotor de la cepa huésped por uno fuerte, ya que en nuestro caso el promotor *vs1* de *Streptomyces Venezuelae* haría más eficiente la producción y secreción. Ya que tiene una capacidad de inicio de la transcripción mayor que los promotores *aph* y *ermEp* (Van Mellaert y col., 1998).

El terminador fue otro punto importante, ya que la correcta terminación de la transcripción contribuye a la estabilidad del ARNm y por tanto en la traducción de la proteína (Pulido y Jiménez 1987).

El vector de clonación en *Streptomyces* fue pIJ486, es derivado del plásmido pIJ101, con terminador incluido, y marcador de resistencia al tioestrepton.

La secuencia Shine Dalgarno fue ubicada 5-12 nucleótidos río arriba del codón de inicio de la traducción, según lo recomendado por Strohl 1992, nuestro codón de inicio fue ATG, ya que influye en la traducción, así como la estabilidad del ARN.

La fusión de un péptido señal a una proteína, constituye una unidad de translocación única que ha sido utilizada como herramienta molecular para optimizar los rendimientos de las proteínas secretadas. Nuestra construcción lleva la secuencia señal de *vs1* (*vs1-ss*), del inhibidor de subtilisina de *Streptomyces venezuelae* CBS762.70, un péptido señal reportado con amplio grado de secreción. (Lammertyn y col., 1997; Lammertyn y col., 1998).

En *Streptomyces* se han descrito dos vías de secreción la vía Sec y la vía Tat. La vía Sec fue usada para la secreción del péptido de interés, en esta vía las proteínas

se sintetizan con un péptido señal removible, en su extremo amino por una SPasa tipo I, las cuales son esenciales para la viabilidad celular. La eliminación de las SPasas conlleva a la acumulación de proteínas precursoras en la membrana citoplasmática y posteriormente a la muerte celular (Koshland y col., 1982; Dalbey y col., 1985). *Streptomyces lividans* contiene al menos cuatro SPasas tipo I: W, X, Y, Z (Schacht y col., 1998; Parro y Mellado., 1998; Parro y col., 1999).

Clonación del minigen para *Streptomyces lividans* Tk24.

Una vez diseñado el *cassette in silico*, se mandó sintetizar el minigen, clonado en el vector pIDT-smart donde se amplificó y del cual se extrajo el minigen digiriéndolo con las enzimas de restricción BamH1 y HindIII. Se realizaron mezclas de ligación con el vector pIJ486 y se transformaron células de *Escherichia coli* DH5 α por electroporación y se realizaron cultivos en medio LB líquido, de las transformantes. Una vez crecidas las transformantes se obtuvo el ADN plasmídico por minipreparaciones. Tanto el minigen como el vector se digirieron con las enzimas de restricción BamH1 y HindIII, una vez digeridos, se corrió un gel con la muestra para verificar la digestión y se purificaron las bandas correspondientes a nuestro minigen y nuestro vector.

Protoplastos.

La transformación de esta cepa se realizó mediante la formación de protoplastos, para lo cual se colocó un precultivo de 48 h de *Streptomyces lividans* Tk24 en medio YEMEG a 30°C y 220 rpm. Al siguiente día a un matraz con 250 ml de medio S, se adicionaron 50 ml de glucosa y 12.64 ml de glicina al 20%. De este matraz se tomaron 45 ml a los cuales se les agregó el precultivo homogeneizado y se incubó a 30°C por 24 h a 220 rpm, este cultivo se centrifugó a 8000 rpm durante 8 min, se descartó el sobrenadante, el "pellet" se lavó con regulador PTC, se centrifugó bajo las mismas condiciones y se resuspendió en 5 ml de solución de lizozima, se incubó a 30°C con agitación de 120 rpm por 15 min y se agregaron 10 ml de regulador PTC adicionado con 20 mg/ml de lizozima, se mezcló por pipeteo

vigorosamente y se centrifugó a 800 rpm durante 5 min. Esta suspensión se pasó a otro tubo y se centrifugó a 8000 rpm durante 8 min, se descartó el sobrenadante y el "pellet" se resuspendió en PTC, se hicieron alícuotas de 200 µl y se conservaron a -70°C hasta su uso.

Transformación de *Streptomyces lividans* Tk24 por protoplastos.

Se prepararon cuatro cajas con medio R₂ suplementadas con CuSO₄.5H₂O (2mM-1/100) y CaCl₂.2H₂O 36.8% (1/100). A un tubo con 200 µl de protoplastos, se agregaron 10 µl de la mezcla de ligación previa y 500 µl de PEG6000 al 35% (v/v). Se mezcló y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Con esta mezcla se sembraron las cajas de medio R₂ colocando 150 µl y las cajas se incubaron a 30°C por 24 h con el fin de que los protoplastos se regeneraran. Después de este tiempo se agregó tioestrepton a una concentración de 50 µg/ml y se dispersó en la caja dejando crecer las transformantes durante 24 h más.

Selección de transformantes por PCR de Colonia

Para realizar el PCR de colonia que nos ayudó a verificar que el *Casette* de expresión se encontraba en las transformantes, se utilizaron *primers* específicos para pIJ486, se maceró la colonia transformante, la cual se tomó como ADN molde en la PCR y en un tubo Eppendorf se colocaron (Regulador 5x, Mg Cl₂, dNTPs, primers Fw y Rv, Enzima taq polimerasa y ADN molde). El programa usado es el reportado por [Soliveri y col. \(1999\)](#). Posteriormente se comprobó que las transformantes incluyeran el inserto por secuenciación automatizada y se realizaron bioensayos para comprobar que el péptido se produjera y secretara al medio.

Condiciones de fermentación

De un precultivo de 48 h de la transformante, en medio Phage con tioestrepton (50 mg/ml) a 30°C y 150 rpm, se pesaron 10g de biomasa que se homogeneizaron con 90 ml del mismo medio, se tomó la biomasa que se encontraba en 1 ml de esta muestra, se lavó y se sembró en 99 ml de medio R₂ líquido sin antibiótico

(Hopwood y col., 1985), durante 6 días bajo las condiciones ya descritas. Al cabo de ese tiempo, se filtró la biomasa y se realizaron ensayos de actividad con la biomasa y el sobrenadante.

Ensayos de actividad sobre fitopatógenos.

El primer ensayo realizado fue el ensayo denominado "cobertera". Este consiste en sembrar 50 μ l de alguna de las transformantes sobre agar R2 (en un diámetro de 2.5 cm), dejarla crecer por al menos seis días y al cabo de ellos, colocar una cubierta de medio LB al 1%, con algún fitopatógeno embebido, lo que ocasiona que el péptido secretado por la transformante, difunda hacia el medio que contiene el fitopatógeno ejerciendo su actividad y dejando un halo de inhibición sobre la región en la que difundió. Se realizó un segundo ensayo colocando 100 μ l sobre el mismo diámetro y en ambos se obtuvo actividad (Figuras 24, 26 y 27).

Para descartar que la actividad presentada se debiera a un metabolito secundario propio de *Streptomyces lividans* y no al péptido, se realizó una fermentación en medio líquido que duró seis días y a la cual se le retiró la biomasa por filtración rápida. El sobrenadante se colectó en unidades de ultrafiltración Amicon®, con membrana de celulosa regenerada para proteínas menores a 3.0 KDa, considerando que el péptido tiene una masa promedio de 3.51 KDa, quedó retenido con las proteínas mayores a 3.0 KDa, por lo que al realizar los bioensayos se esperaba que esta fracción presentara actividad y que el efluente careciera de ella.

Una vez comprobada la actividad en el sobrenadante, nos dimos a la tarea de encontrar un medio óptimo de producción. Se realizaron fermentaciones en medios líquidos como el medio mínimo, medio R₂, Undecil prodigiosina, AN, caseína, BTBS Y TSB, obteniendo la mayor producción en medio R₂. Debido a que este es un medio completo y caro para la producción se realizó la simplificación de sus componentes (Hopwood y col., 1985), para eficientar el proceso y disminuir los costos.

En la [tabla 3](#) se enlistan las modificaciones realizadas al medio R₂ con el fin de obtener un medio de producción eficaz y de bajo costo.

Tabla 3. Modificaciones al medio de producción

Abreviatura	Modificación
R ₂	Ninguna
R ₂ TES-	Medio R2 sin Regulador TES
R ₂ CA-	Medio R2 sin casaminoácidos
R ₂ CA- EC+	Medio R2 sin casaminoácidos y con extracto de carne
R ₂ LLP-	Medio R2 sin lab lemco powder
R ₂ LLP- CA-	Medio R2 sin Lab lemco poder y sin casaminoácidos

Se realizaron fermentaciones con cada una de las modificaciones citadas y bajo las condiciones ya descritas. Al sobrenadante se le realizó una ultrafiltración obteniendo dos fracciones de cada muestra y con ellas se realizaron bioensayos de actividad en pozo.

Bioensayos por pozo y Curva de concentración

Se realizaron bioensayos de actividad por pozos con ambas fracciones según lo reportado por [Berghe y Vlietinck 2005](#), se prepararon cajas con medio LB inoculadas con suspensión microbiana de los fitopatógenos (1×10^6 UFC). Se perforaron pozos y se colocaron 100 μ l del sobrenadante filtrado en diferentes diluciones. Para el Stock de B15 (péptido sintético-control positivo-) se disolvió una cantidad previamente calculada del péptido liofilizado en 1ml de solución-pep (debido a que este no es soluble en agua), correspondiente a 16.5 mg/ml. A partir de ésta, se hicieron diluciones hasta obtener concentraciones de 0.0132, 0.0099,

0.0066 and 0.0033 mg/ μ l (Figura 29) y un control negativo (medio líquido), la placa se incubó por 16 h para permitir la difusión de la muestra en el medio, y el crecimiento del microorganismo indicador para entonces medir los halos de inhibición. Para cada punto de la curva se realizaron tres mediciones.

Identificación y Perfil Densitométrico

Para la identificación del péptido se usó la metodología descrita por Schägger (2006), que recomienda el uso de geles de poliacrilamida y tricina SDS-PHAGE al 16% con 6M de Urea, para separar péptidos de 1-500 kDa ofreciendo alta resolución y visualizando un mínimo de 0.2 μ g de péptido. Se usó el stock de acrilamida AB-6 y el regulador de carga B. La corrida electroforética se desarrolló durante 120 min a 100 volts y las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie. Los geles fueron escaneados y las imágenes se analizaron en un foto-documentador (Gel Doc™ EZ) de BIO-RAD para generar un perfil densitométrico de las bandas.

Muestras concentradas

Los sobrenadantes obtenidos por ultrafiltración se colocaron en un *speedVac* y se concentraron 10 veces (de 1000 μ l a 100 μ) y se incluyeron en los bioensayos de actividad (figura 29).

RESULTADOS

En los últimos años uno de los AMP que ha sufrido diversas modificaciones, es lactoferricina (Lfcn), péptido catiónico que deriva de la hidrólisis del dominio N de la lactoferrina (Lf), se libera de manera natural en el organismo, debido a la acción de la pepsina gástrica. Presenta una alta homología entre las diferentes especies de mamíferos (Tabla 1). Sin embargo, la Lfcn de origen bovino exhibe mayor potencia bactericida comparada con la Lfcn humana, murina y caprina (Vorland y col., 1998).

Tabla 1. Homología entre la secuencia de aminoácidos de lactoferrinas de diferentes especies.

Especie	Secuencia N terminal	Posición
Búfalo	LKCHRWQWRMKKLGAPSITCVRRAFV	17-42
	SQPEWLKCHRWQWRMKKLGAPSITCVRRAFV—LECIRA	12-48
Vaca	FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRFAFA	17-42
	SQPEWFKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRFAFA—LECIRA	12-48
Camello	SKCAQWQRRMCKVGRGPSVTCVKKTSR	17-42
	SPAESSKCAQWQRRMCKVGRGPSVTCVKKTSR—FECIQIA	12-48
Cabra	SKCYQWQRRMRKLGAPSITCVRRRTSA	17-42
	VLPEWSKCYQWQRRMRKLGAPSITCVRRRTSA—LECIRA	12-48
Humano	TKCFQWQRNMRKVRGPPVSCIKRDSP	17-42
	SQPEATKCFQWQRNMRKVRGPPVSCIKRDSP—IQCIQA	12-48
Ratón	EKCLRWNEMRKVGGPPLSCVKKSSST	17-42
	SNSEEEKCLRWNEMRKVGGPPLSCVKKSSST—RQCIQA	12-48
Cerdo	SKCRQWQSKIRRTN-PIF-CIRRASP	19-42
	STAEYSKCRQWQSKIRRTN-PIF-CIRRASP—TDCIRA	14-48
Caballo	AKCAKFORNMCKVGRGPSVSCIRKTSS	17-42
	SPAEAAKCAKFORNMCKVGRGPSVSCIRKTSS—FECIQIA	12-48

También se ha observado un aumento de la actividad antimicrobiana, al modificar químicamente a los péptidos de lactoferrina, aumentando sus cargas positivas. Es probable que la lactoferricina tenga un efecto bactericida mayor que el de la Lf, debido a su tamaño, ya que al ser más pequeña que ésta, no presentará un efecto estérico sobre la superficie bacteriana, pudiendo introducirse fácilmente, actuando directamente sobre la membrana interna. La lactoferrina y la lactoferricina se unen a la pared celular causando la liberación del lipopolisacárido y alterando su permeabilidad. Esta alteración facilita la acción de la lactoperoxidasa y otras proteínas de defensa, sobre la bacteria. La lactoferrina queda unida a la pared

Resultados

celular, mientras la lactoferricina, de menor tamaño, puede penetrar hasta la membrana, provocando un mayor daño en el microorganismo. (Yamauchi y col., 2001).

La secuencia de la Lfcin con actividad antibacteriana, está constituida por los aminoácidos 1–47 de la Lf humana (Lfh) y 17–41 de la Lf bovina (Lfb). Se han llevado a cabo estudios *in vivo* e *in vitro* con péptidos sintéticos que indican, que la actividad antimicrobiana de la Lfh, se debe a la presencia de 4 argininas cargadas positivamente, localizadas entre los aminoácidos 1 y 5 de su extremo N terminal Lfcin y péptidos derivados de ella se han utilizado para estudiar el papel de los residuos de aminoácidos en la actividad antimicrobial y su modo de acción y para la optimización las propiedades antimicrobianas. Algunas observaciones microscópicas han demostrado que los micelios de *P. digitatum* tratados con LfcinB17-31 desarrollaron alteraciones en crecimiento, esporulación, depósito de quitina, y la permeabilidad de las células de las hifas. También se ha probado que tiene actividad contra levaduras y no presenta toxicidad para las células vegetales y animales (Wakabayashi y col., 1999; Nikawa y col., 2004).

Se seleccionó un péptido que cumpliera con las características y con cualidades mencionadas en la introducción, lo que sugiere fuerte actividad antibacteriana. Un típico AMP catiónico, de origen mamífero, y sin toxicidad hacia las células vegetales y animales. Se trata de un péptido con múltiples funciones biológicas, en su mayoría relacionadas con la defensa del huésped.

Primera estrategia

El primer paso fue la elaboración del minigen que codifica para el péptido de interés, quedando de la siguiente forma:

PEP-B15

5' **tat gtt** caa atg ccg tcg ttg gca gtg gcg tat gaa aaa act ggc tgc **tta aa** 3'

Resultados

3' **aca** agt tta cgg cag caa ccg tca ccg cat act ttt ttg acc gac gaa ttt **tcg** a 5'

Este minigen, fue sintetizado en forma química e insertado en el vector de expresión pET17-b el cual fue amplificado en células de *Escherichia coli* DH5 α , obteniendo la construcción (pET17b-B15), se realizaron cultivos de las transformantes en medio LB líquido para obtener ADN plasmídico por minipreparaciones y con esta construcción, se transformaron células electrocompetentes de *Escherichia coli* BL21 (DE3) *pLysS* por electroporación. En la [figura 9](#), se aprecia que el nivel de transformación fue bajo. Un indicador de la elevada toxicidad del péptido sobre la célula huésped, o quizá, un efecto de la electroporación *per se*, incluso pudo tratarse de la combinación de ambas.



Figura 9. Transformantes de *Escherichia coli* BL21 (DE3) *pLysS*.

La comparación en las cinéticas de crecimiento de las transformantes y la cepa progenitora, nos hicieron concluir que el momento adecuado para la inducción sería a partir de las cuatro horas de crecimiento, ya que el cultivo hasta ese momento se encuentra en fase exponencial [figura 10](#). Sin embargo, después de repetir la inducción, no se encontró ninguna diferencia entre el crecimiento del cultivo control y la transformante.

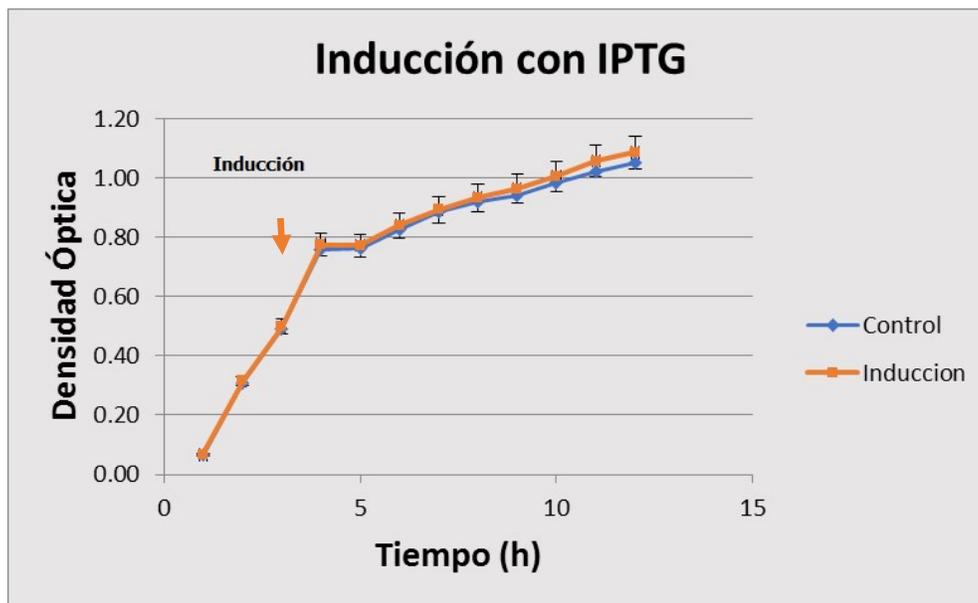


Figura 10 Cinética de crecimiento e Inducción de las transformantes y la cepa control.

La muestra se sonicó (5x20s) y posteriormente se colocó en el vortex con perlas de cristal durante 20 minutos, se centrifugó a 12,000 rpm y se realizaron bioensayos de actividad con el sobrenadante sobre diferentes fitopatógenos [figura 11](#), pudimos comprobar que no existió actividad sobre ninguno de ellos, quizá porque el péptido no se encontraba en el sobrenadante o se encontraba en una concentración tan pequeña que no tuvo el efecto esperado en los fitopatógenos (recordemos que estos péptidos requieren de cierta concentración para ejercer su efecto). Otra posibilidad es que la metodología usada para romper los cuerpos de inclusión no tuviera efecto y la mayor cantidad de péptidos quedaran dentro.

Resultados

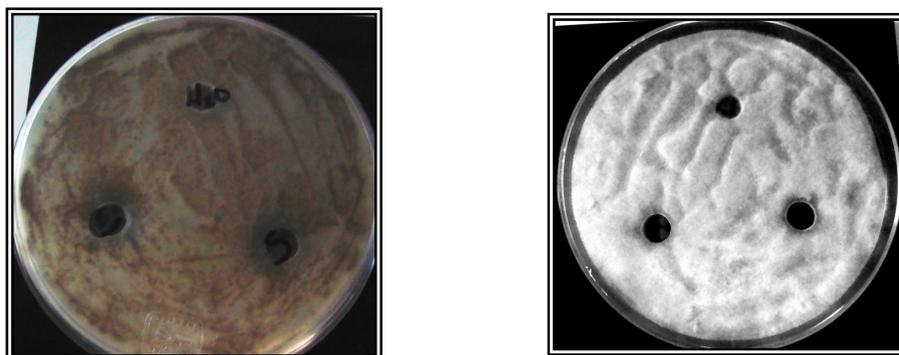


Figura 11. Bioensayos de actividad en pozos del péptido sobre diferentes fitopatógenos. Izq. *Alternaria sp.* crecida en agar LB 2%; Der. *Fusarium sp.* crecida en agar LB 2% (arriba control negativo, derecha sobrenadante con IPTG, Izq. sobrenadante sin inducción).

Debido a estas razones no se puede descartar esta estrategia hasta no comprobar si los resultados se deben a una inducción incorrecta, a que las células transformadas no contienen el inserto o a una incorrecta lisis.

Segunda estrategia.

En la segunda estrategia, se diseñó el minigen para el modelo de la bisagra, con codones de uso preferencial para *Escherichia coli*, para el cual la secuencia de oligonucleótidos quedó de la siguiente manera:

```
5'catatg atg gac gtt gac gaa gct gac gct aaa gct gac gaa tct gaa gct tct cag ccg  
gaa tgg cgt ccg tcc aaa tgc cgt cgt tgg cag tgg cgt atg aaa aaa ctg gaa gct ctcgag  
3'
```

En donde: Sitios de corte *NdeI* y *XhoI*, Péptido complementario, Bisagra, Péptido B15.

Antes de encontrar este modelo, se construyeron diferentes secuencias de oligonucleótidos, que se enviaron a una base de datos (I-TASSER), encargada de predecir sus estructuras y posteriormente se sometieron a diferentes pruebas. En

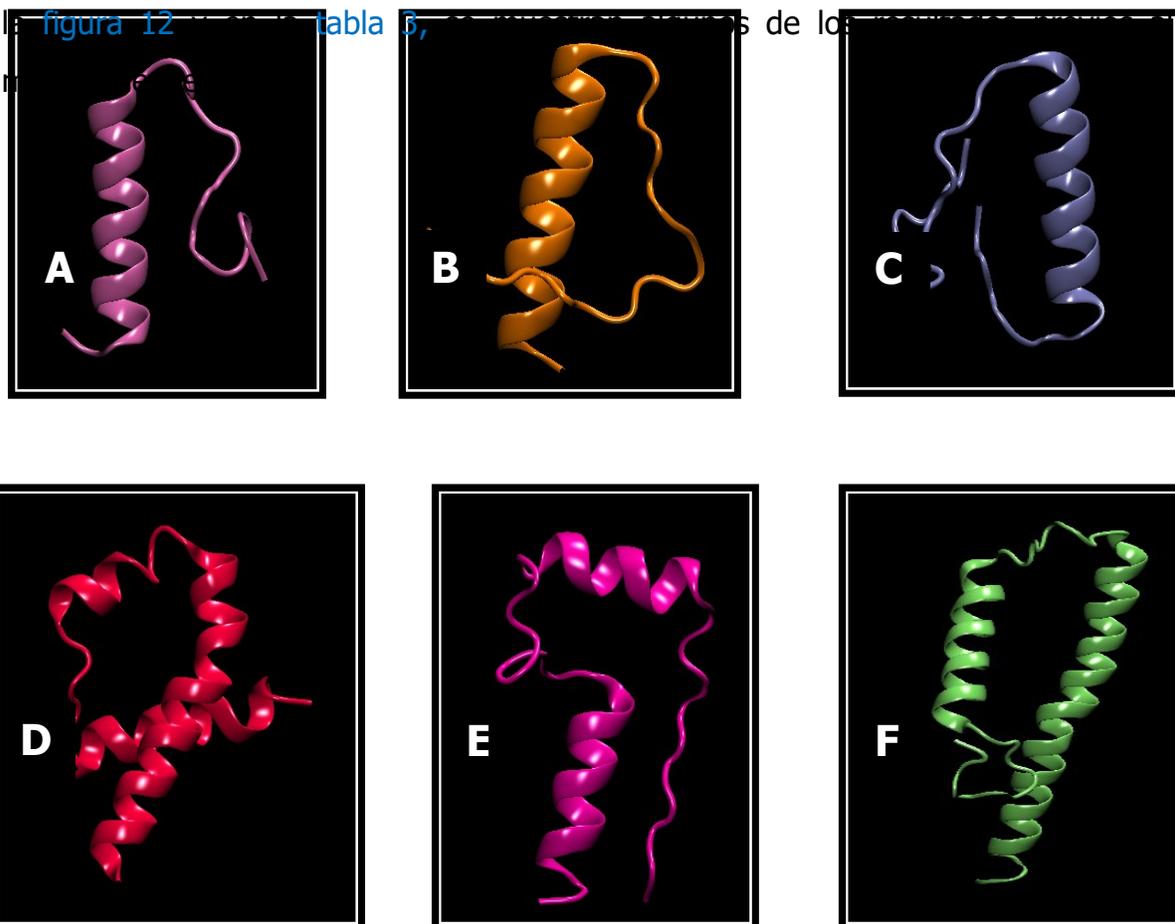


Figura 12. Estructuras obtenidas durante el modelamiento de la bisagra A) C-score-1.83; B) C-score-1.73; C) C-score-1.90; D) C-score -1.81; E) C-score -1.53; F) C-score-2.53

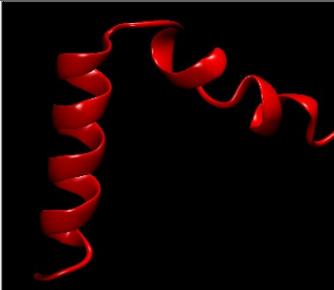
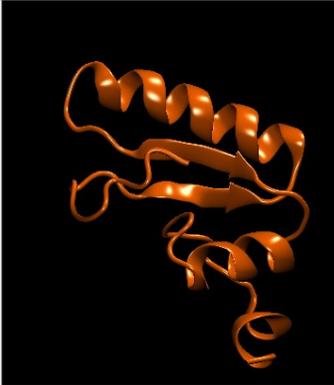
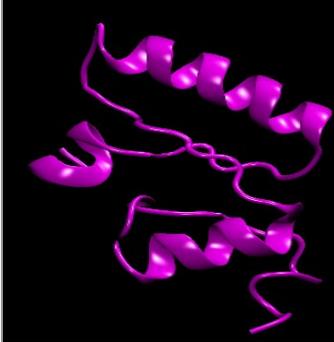
Como se aprecia en la [figura 12](#) varios de los modelos cumplieron con la estructura esperada, es decir, el péptido de interés enfrentado a un péptido complementario que interactúa con sus cargas y por ende altera su estructura y posiblemente su actividad antimicrobiana. Sin embargo, de acuerdo al modelador su estabilidad y confiabilidad no era la mejor, por lo que, se tomaron en cuenta diferentes medidas de estructura y estabilidad, para elegir el modelo adecuado a nuestras necesidades

Resultados

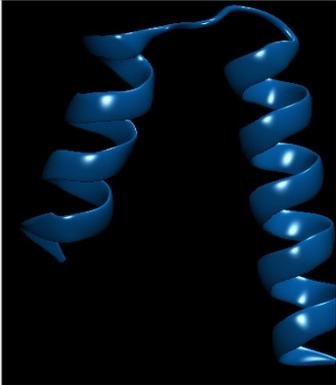
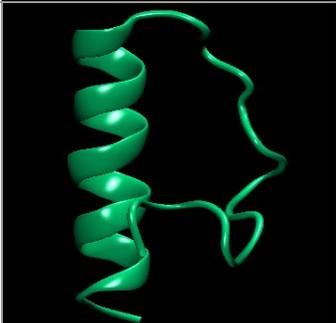
(tabla 3). Esto se realizó con los más de 50 modelos realizados para el péptido bisagra.

Tabla 4. Datos de las estructuras y medidas de confiabilidad de algunos de los modelos realizados en I-TASSER para la bisagra.

Tabla 4.

MODELO	SECUENCIA	C-SCORE	TM	ESTRUCTURA
S58440	TSCDEADAASDEAEGSQ PEWFKRRWQWRMKKLEA	-1.66	0.51±0.15	
S58537	MDVDEADAGADESEASQ PEWFKCRRWQWRMKKLEA FKCRRWQWRMKKLEASQP EWM DVDEADAGADESEA	-0.58	0.64±0.13	
S58608	MDVDEADAGADESEASQ PEWFKCRRWQWRMKKLEA FKCRRWQWRMKKLEAFSQ PEWMDVDEADAGADESEA	-1.18	0.57±0.15	

Resultados

S58158	ESEMEDVEADAGADESEASQ PEWFKRRWQWRMKKLAA	-1.55	0.52±0.15	
S54616	MDVDEADAGADESEASQ PEWFKCRRWQWRMKKLEA	-1.90	0.49±0.15	

Para la elección de este modelo se tomaron en cuenta diversos factores: la conformación estructural, esto es, que cada una de las partes que lo constituyen, cumplieran con la función que les fue asignada, que la mayoría de las uniones entre los aminoácidos se encontraran sin tensiones, que los obligaran a forzar sus movimientos, es decir, evitando los choques estéricos. Esto pudo ser determinado con ayuda de los diagramas de Ramachandran, con los que se eligieron los modelos que presentaban un menor número de aminoácidos en zonas no permitidas.

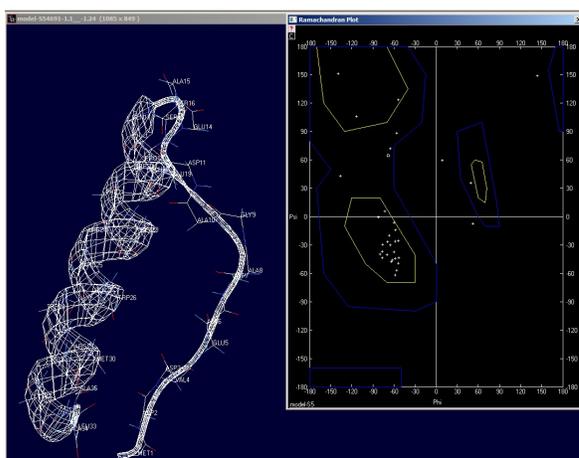


Figura 13. Diagrama de Ramachandran. Los aminoácidos que se encuentran dentro de la zona amarilla son aquellos que presentan menor tensión y por tanto mayor grado de certeza, los de la zona azul, presenta un poco de tensión, pero siguen siendo confiables y aquellos que se

encuentran fuera de estas dos zonas son los que presentan mayor tensión y se encuentran forzados y por tanto presentan desviaciones.

Para comparar la aproximación del modelo a las estructuras depositadas en las bases de datos de proteínas (Protein Data Bank -pdb-), se tomó en cuenta el *C-score* que es una medida de confiabilidad que va de (-5 a 2) y que nos indica el grado de certeza o confiabilidad que tiene nuestro modelo (existe un mayor grado de confiabilidad, mientras más cercano a 2 se encuentre). La TM y el RMSD son medidas de la similitud estructural entre dos modelos, cuando la estructura nativa es conocida. Una TM-score > 0.5 indica una buena topología del modelo y una TM-score < 0.17 indica similitud al azar.

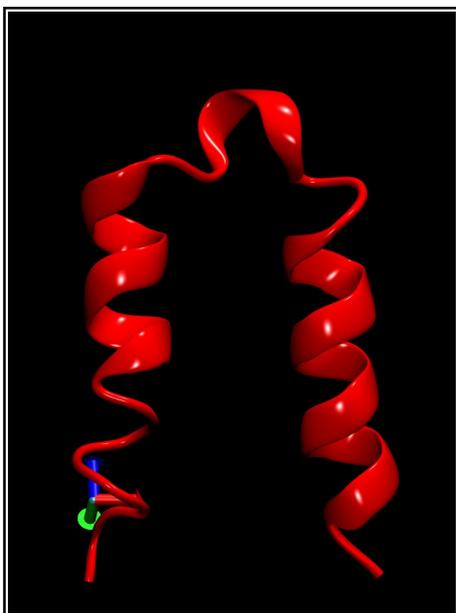


Figura 14. Modelo de la secuencia de oligonucleótidos elegida para la propuesta de inactivación por bisagra con una *C-score* de -1.87.

Se eligió el modelo que mostró mayor estabilidad en su conformación y con menos puntos de tensión entre sus aminoácidos, con mayor grado de confiabilidad y mayor estabilidad, después de analizar las simulaciones (conservando la estructura de bisagra). Como se puede observar en la [figura 14](#) el modelo para la bisagra adopta conformación **hélice- α** , los aminoácidos que conforman la bisagra cumplen la función adecuada formando un bucle que hace que el péptido complementario quede justo frente a B15, con lo que las cargas de sus aminoácidos interactúan reduciendo o incluso inhibiendo su actividad.

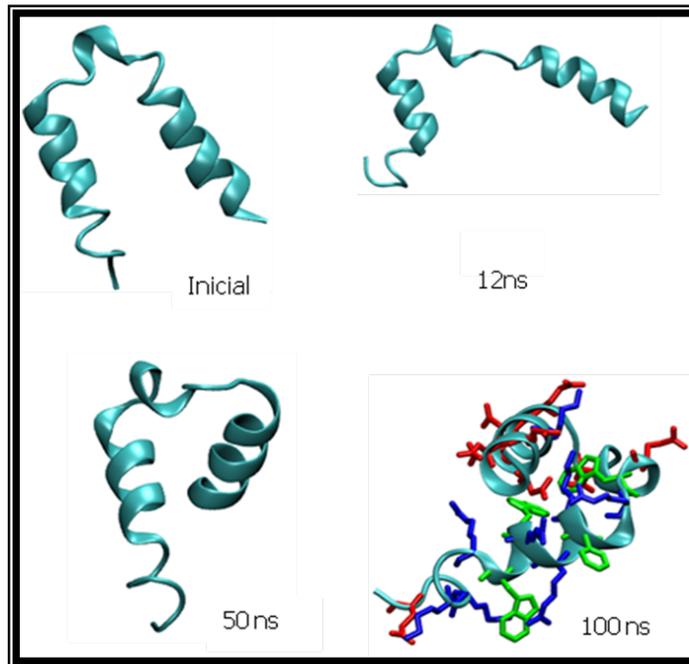


Figura 15. Simulación en caja de agua para el modelo de inactivación por bisagra.

En la [figura 16](#) se muestra un análisis realizado a la estructura de la bisagra, en la cual se compara la Rmsd (conformación inicial y final) de la estructura conocida contra la propuesta a lo largo de 100 nanosegundos (ns).

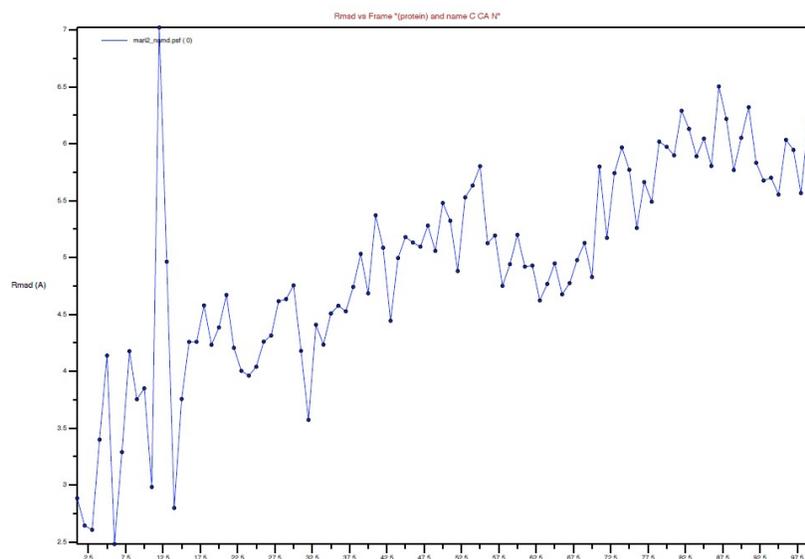


Figura 16. Rmsd de la bisagra a lo largo de 100ns

La estabilidad de la bisagra se analizó al realizar una simulación en caja de agua, esta simulación se realizó bajo condiciones periódicas a la frontera, analizando los cambios que presenta la bisagra al interactuar con otros elementos. En las [figuras 15 y 16](#), se puede observar un pico disparado a los 12 ns, que indica que la conformación se ha perdido (es decir la estructura final se parece muy poco a la inicial) sin embargo, a los 17 ns la estructura se estabiliza y su conformación se mantiene al correr de los 100 ns, lo que muestra la estabilidad que tiene el modelo en su interacción con los componentes que se encuentran en el solvente, ya que sus aminoácidos quedan expuestos. Ambos péptidos conservan posturas que permiten la inactivación de las cargas, lo que hace suponer que estando en contacto con la membrana, también conservarían estas características, facilitando así que la parte hidrofóbica interactúe con la membrana y la parte hidrofílica se exponga al solvente dejando a los aminoácidos que conforman la bisagra expuestos para el momento de la activación (comprobado por comparación de estructuras a lo largo de 100 ns -[figura 16](#)-). Las simulaciones en caja de agua, se desarrollaron en el Centro Nacional de Súper cómputo con el programa NAMD2.7b2 ([figura 15](#)), lo que nos ayudó con la elección de un modelo que alcanzó una *C-score* de -1.87 ([figura 14](#)) y es estable a lo largo de 100ns de simulación.

Con los resultados obtenidos podemos decir que establecieron las bases para la clonación y expresión de la bisagra en *Escherichia coli* BL21 (DE3) *pLysS*, encontrando un sistema de expresión que tiene la cualidad de mantener el gen de interés reprimido, por lo que puede ser útil en la expresión del péptido que es potencialmente tóxico para la célula hospedera ([Novagen, 2003](#)) y el desarrollo de diversos modelos con estructuras estables para la inactivación por bisagra ([figura 12](#)).

Resultados

Tercera estrategia

Para esta parte se construyó el *casette* de expresión para *Streptomyces lividans* Tk24, el cual se clonó en el vector pIJ486.



Figura 17. *Casette* de expresión para *Streptomyces lividans*.

■ Corte para enzimas de restricción, ■ promotor, □ secuencia Shine Dalgarno, ■ codón de inicio, ■ péptido señal, □ péptido de interés, ■ aminoácido modificado, ■ codón de paro.

Este *casette* se clonó en el vector pIDT-smart en donde fue amplificado. Posteriormente, se digirió el minigen con las enzimas de restricción HindIII y BamH1, también se digirió con estas enzimas el vector pIJ486, que fue el vector que se utilizó para la transformación *Streptomyces lividans* TK24.

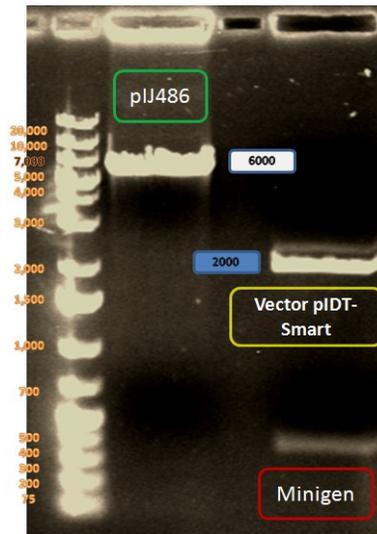
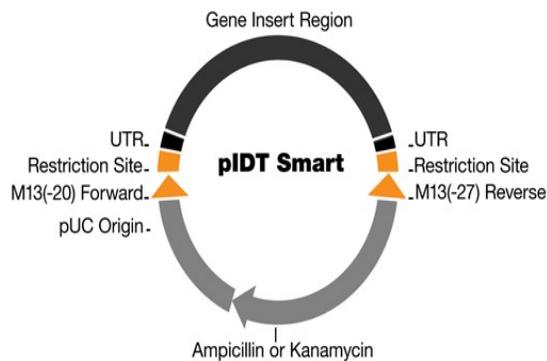


Figura 18. **Izq.** Vector pIDT smart, usado para amplificar el cassette de expresión y que incluye un gen de resistencia a ampicilina; **Der.** Gel de digestión, se pueden apreciar las bandas correspondientes al vector pIDT smart y minigen en el carril derecho y una banda que corresponde al vector pIJ486 digerido con HindIII y BamH1 en el carril central, el marcador de peso molecular se encuentra a la izquierda.

La transformación de *Streptomyces lividans* Tk24 se llevó a cabo por protoplastos, como se describe en la metodología, obteniendo un alto número de transformantes, como se puede apreciar en la [figura 19](#).



Resultados

Figura 19. Transformantes de *Streptomyces lividans* TK24, obtenidas por protoplastos

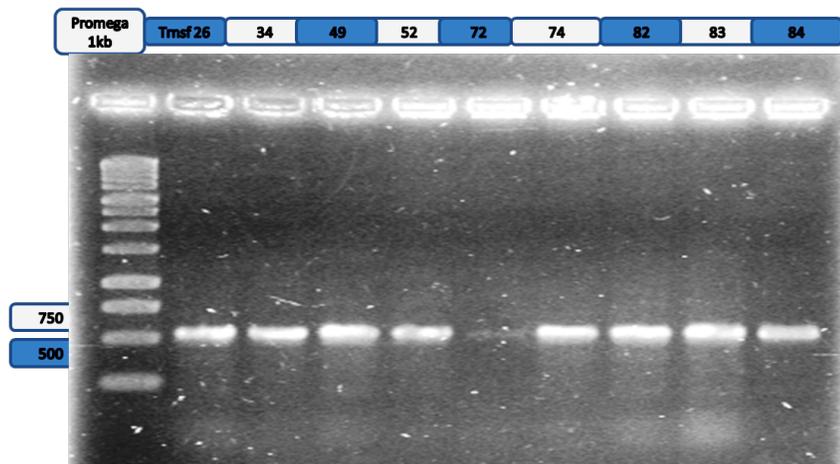
Obtenidas las transformantes, se establecieron las condiciones para la amplificación del fragmento de interés y se realizó un PCR de colonia para comprobar la presencia de B15. Este PCR se realizó con *primers* específicos, que flanquean el sitio múltiple de clonación del vector pIJ486 (Soliveri y col, 1999), lo que asegura que la región amplificada, corresponde al péptido de interés, ya que este se encuentra clonado precisamente en esta región. El programa establecido para realizar el PCR, es el siguiente:

Tabla 5. Condiciones para PCR

PCR DE COLONIA			
Desnaturalización	95°C	2 min.	30 ciclos
	95°C	30 Seg.	
Anillamiento	56°C	1 min.	
Elongación	72°C	3 min.	
Extensión	72°C	5 min.	

La figura 19 muestra el alto porcentaje de transformación en las colonias analizadas. Se observa una banda entre 500 y 750 pb, correspondiente a B15.

Flanquean, sitio múltiple de clonación de pIJ486 [A1 (5'CGCAATTCCTTTAGTTGTTCC-3')
[A2 (- 5'GCGAAACGATCCTCATCC-3')]. (Soliveri et al.,1999).



Resultados

Es importante mencionar que la transformación y la secuenciación se realizaron por duplicado y se obtuvieron los mismos resultados. Con algunas de las transformantes se realizaron varios ensayos de actividad, con la finalidad de comprobar si el péptido se producía, si era secretado por la transformante al medio y si era activo contra algún fitopatógeno.

A un cultivo de seis días de crecimiento, se le retiró la biomasa por filtración rápida, el sobrenadante se colectó en unidades de ultrafiltración Amicon®, para proteínas menores a 3.0 KDa, ya que el péptido tiene una masa promedio de 3.51 KDa, quedó retenido con las proteínas mayores a 3.0 KDa. Se realizaron bioensayos de actividad con ambas fracciones (la mayor y la menor a 3 KDa).

En el primer ensayo por cobertera sembraron 50 μ l de la transformante, en medio R₂ por seis días y una vez crecida se coloca sobre ella una cobertera de agar LB que contiene al fitopatógeno embebido [figuras 22 y 23](#). Se incubó por 48 h a 30°C y se realizan las lecturas de los halos de inhibición que produce el péptido.



Figura 22. *Bacillus subtilis* embebido en cobertera de medio LB y crecido por 48 h sobre cultivo de la transformante 6.

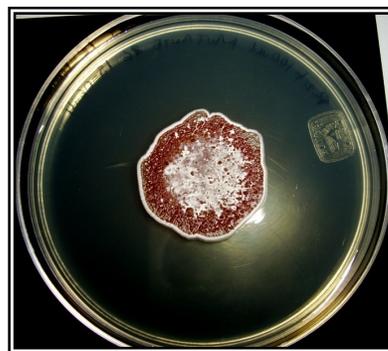


Figura 23. Transformante N°6 crecida en agar R2 por 6 días, 30°C

Resultados



Figura 24. Transformante N°4 (cepa denominada TB15'4) con cobertera de *Bacillus subtilis*.



Figura 25. Cepa progenitora (*S. lividans* Tk24), con cobertera de *Bacillus subtilis*.

En las [figuras 24 y 25](#), se realiza una comparación entre la cepa progenitora y la transformante B15, ambas con cobertera de *Bacillus subtilis*.

En las [figuras 26 y 27](#) se muestran los resultados de la inhibición que ocasiona la transformante en el crecimiento del microorganismo indicador (*Bacillus subtilis*), usando una mayor concentración de esta (100 μ l -segundo bioensayo por cobertera-).



Figura 26. Inhibición total que forma la transformante B15 sobre *Bacillus subtilis*

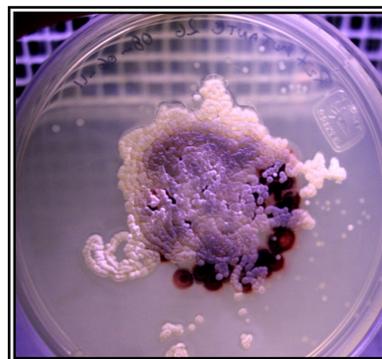


Figura 27. Inhibición que forma la transformante N°26 sobre *Bacillus subtilis*.

Resultados

Medios de producción

Como se mencionó en la metodología, se simplificaron los componentes del medio R₂ para eficientar el proceso y reducir los costos encontrando que además del medio R₂, también existía actividad de las transformantes en los medios R₂ LLP⁻, R₂ LLP⁻ CA⁻ y R₂ CA⁻ Ec⁺. Aunque en el último medio la actividad fue parcial, en los dos primeros la actividad aumentó con respecto a la presentada en R₂ completo.

En el caso de R₂ LLP⁻, se encontraron halos de actividad de 23 mm de diámetro en promedio y en el caso de R₂ LLP⁻ CA⁻, llegaron a los 24 mm. Estos resultados sugieren que ni Lab lemco powder, ni casaminoácidos son importantes para la producción del péptido en el medio R₂. Otro resultado importante es que ni en R₂ LLP⁻, ni en R₂ LLP⁻ CA⁻, los sobrenadantes presentaron pigmentación alguna, pero su actividad fue total. Una prueba más de que sugiere que la actividad no proviene de un metabolito secundario.



Figura 28. Diferencia en la coloración de las cepas probadas.

Resultados

Bioensayos por pozo y Curva de concentración

La actividad registrada en los bioensayos sugiere que el CAP, es secretado en forma activa al medio de cultivo, gracias al péptido señal que se encuentra en su extremo amino, esto se ha demostrado en otros estudios en donde se ha usado este péptido señal, secretado vía Sec (Lammertyn y col., 1997; Lammertyn y col., 1998). El fraccionamiento de medio de cultivo realizado para el bioensayo de difusión, comprueba esta teoría ya que, no se encontró actividad alguna en la fracción menor a tres kDa. Fracción en la que se encontrarían los metabolitos secundarios de haberse producido.

En la figura 29 a la derecha, se observa la inhibición del microorganismo indicador en la fracción mayor a 3.0 KDa (línea D), lo que no sucedió en la fracción menor a 3.0 KDa (línea E). A la izquierda se presentan diferentes bioensayos de difusión, con los que se realizó la curva estándar del péptido sintético y se logró una cuantificación del péptido producido, obteniendo una concentración de 11 g/L.

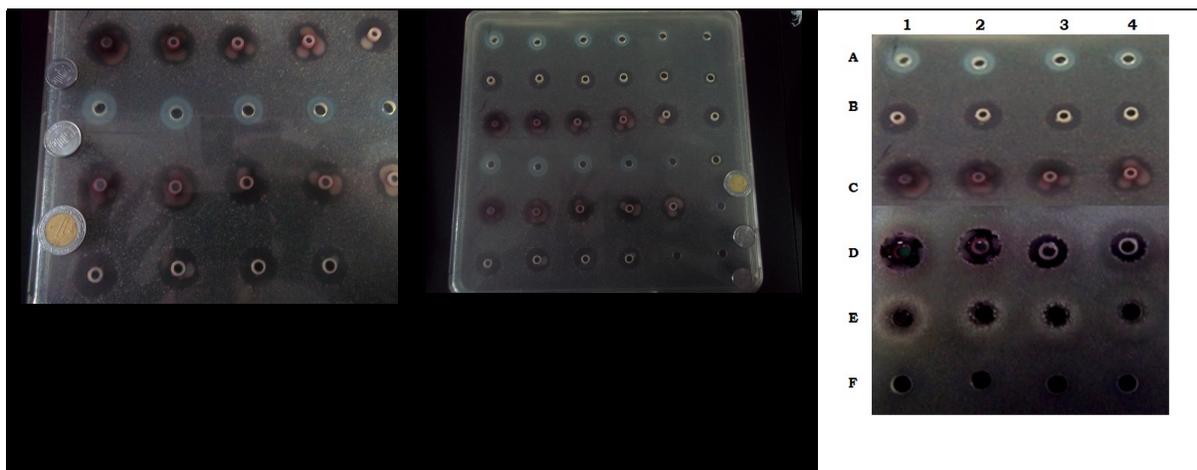


Figura 29. Bioensayos en pozos por difusión. Línea A, Curva de concentración péptido sintético; Líneas B y C, actividad del sobrenadante de seis días de fermentación; Línea D, actividad de fracción mayor a 3 KDa; Línea E, actividad de fracción menor a 3KDa y Línea F actividad del sobrenadante de cepa control. Las Filas 1,2,3 y 4 corresponden a las concentraciones de péptido sintético 0.0132, 0.0099, 0.0066 y 0.0033 mg/ μ l respectivamente.

Resultados

Perfil Densimétrico

Se prepararon geles, para la separación de fragmentos por medio de electroforesis vertical. Para obtener una mayor concentración del péptido y con la finalidad de identificar y facilitar la separación, se corrieron muestras del décimo día de fermentación en geles SDS-PAGE con tricina, a pesar de que se observó actividad a partir de los seis días de fermentación. El rango de separación de estos geles es de: 1-500 KDa.

Péptido sintético

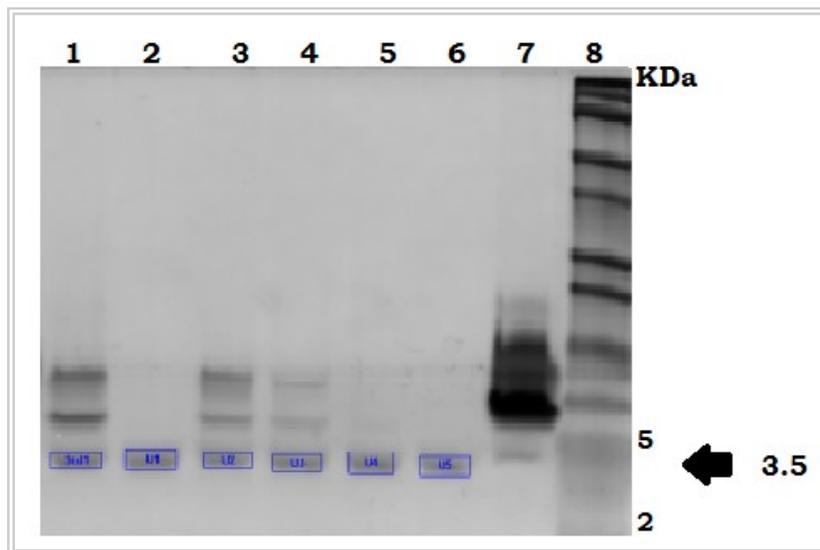


Figura 30. Gel de tricina realizado para el estándar (péptido sintético).

Resultados

Tabla 6. Perfil densitométrico realizado a las muestras de péptido sintético.

R-squared value: R ² = 1

Volume Analysis

No.	Label	Type	Volume (Int)	Adj. Vol. (Int)	Mean Bkgd. (Int)	Abs. Quant. (ug)	Rel. Quant.	# of Pixels	Min. Value (Int)	Max. Value (Int)	Mean Value (Int)	Std. Dev.	Area (mm2)
1	U1	Unknown	3,968,089	194,753	3,023.5	16.6	N/A	1,248	2,904	3,327	3,179.6	85.0	14.5
2	U2	Unknown	2,970,276	117,458	3,047.9	10.0	N/A	936	2,834	3,292	3,173.4	88.1	10.9
3	U3	Unknown	3,378,806	139,368	3,056.1	11.9	N/A	1,060	2,904	3,292	3,187.6	69.6	12.3
4	U4	Unknown	3,959,796	191,838	3,019.2	16.4	N/A	1,248	2,876	3,319	3,172.9	91.0	14.5
5	U5	Unknown	3,725,072	186,850	2,978.3	15.9	N/A	1,188	2,802	3,282	3,135.6	96.6	13.8
6	Std1	Standard	3,248,015	146,605	3,076.8	12.5	N/A	1,008	2,843	3,345	3,222.2	95.4	11.7

En la [figura 30](#) se aprecian las corridas realizadas con el estándar, con ellas se obtuvo la curva de calibración que nos sirvió para la cuantificación del péptido obtenido en el sobrenadante.

Péptido sintético y sobrenadante juntos

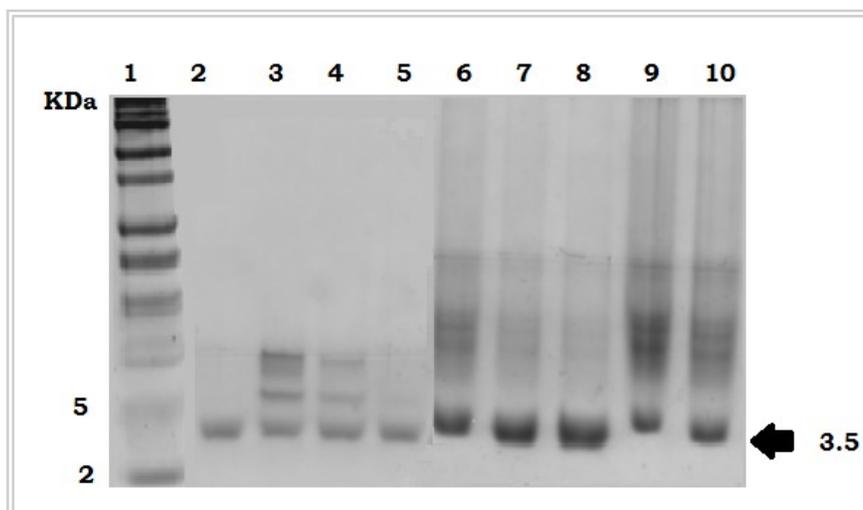


Figura 31. Tricina SDS-PAGE. Gel concentrador al 4%, Gel espaciador al 10% y Gel separador al 16% con 6M de urea y teñido con azul de Coomassie. Se analizó el medio de cultivo de las transformantes. Línea 1 marcador de peso molecular; líneas 2- 5 péptido sintético; líneas 6-10 muestras de medio de cultivo.

Resultados

Las imágenes de los geles de separación, se analizaron en un foto-documentador (Gel Doc™ EZ) de Bio-Rad para generar un perfil densitométrico de las bandas. Usando las herramientas de cuantificación por método absoluto, el programa calcula la concentración en las muestras desconocidas usando la curva de calibración del estándar. De esta forma se realizó una segunda cuantificación con los geles de Tricina SDS-PAGE. Con este método se obtuvo una concentración entre 15 y 16 mg/ml para la estándar [figura 30](#), y mayores para el sobrenadante [figura 32](#), con lo que se corroboran los resultados obtenidos en la cuantificación anterior y que el péptido estudiado, se encuentra en un peso de 3.5 KD.

Muestras de sobrenadante

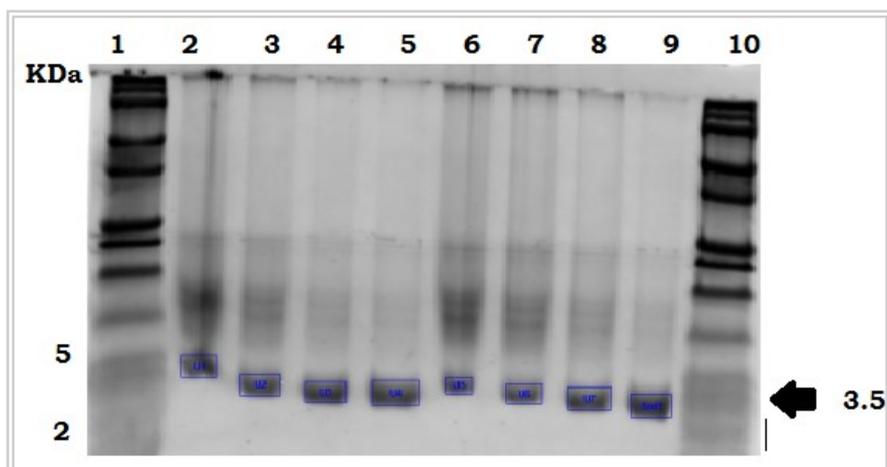


Figura 32. Gel de tricina realizado para las muestras de sobrenadante.

Resultados

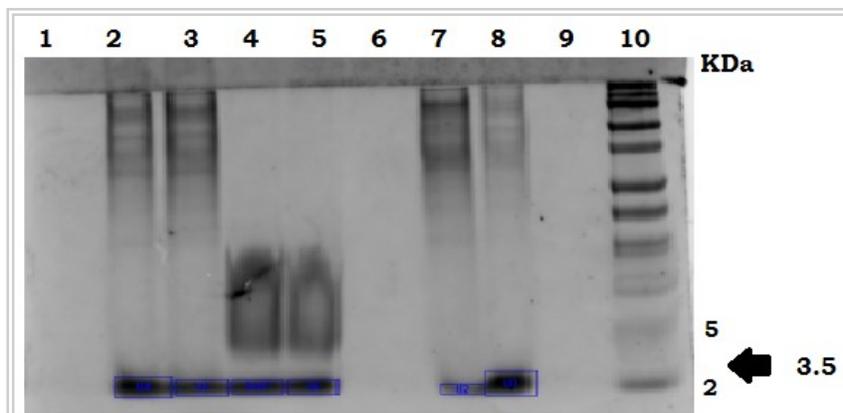
Tabla 7. Perfil densitométrico realizado a las muestras de sobrenadante.

R-squared value: R ² = 1													
Volume Analysis													
No.	Label	Type	Volume (Int)	Adj. Vol. (Int)	Mean Bkgd. (Int)	Abs. Quant. (ug)	Rel. Quant.	# of Pixels	Min. Value (Int)	Max. Value (Int)	Mean Value (Int)	Std. Dev.	Area (mm ²)
1	U1	Unknown	4,615,204	369,692	3,112.5	86.3	N/A	1,364	2,798	3,658	3,383.6	176.8	15.8
2	U2	Unknown	4,492,716	312,445	3,110.3	73.0	N/A	1,344	2,795	3,535	3,342.8	127.8	15.6
3	U3	Unknown	4,634,645	282,612	3,223.7	66.0	N/A	1,350	3,012	3,628	3,433.1	127.8	15.7
4	U4	Unknown	6,431,465	411,606	3,145.2	96.1	N/A	1,914	2,865	3,596	3,360.2	160.7	22.2
5	U5	Unknown	2,279,740	132,940	3,147.8	31.1	N/A	682	2,967	3,510	3,342.7	104.1	7.9
6	U6	Unknown	3,774,848	284,075	3,051.4	66.3	N/A	1,144	2,806	3,500	3,299.7	133.0	13.3
7	U7	Unknown	5,367,201	399,074	3,082.0	93.2	N/A	1,612	2,828	3,597	3,329.5	167.9	18.7
8	Std1	Standard	5,678,670	535,183	3,117.3	125.0	N/A	1,650	2,721	3,666	3,441.6	170.5	19.2

Como se puede apreciar en la [tabla 6](#) las diluciones realizadas al péptido sintético, se encuentran en un rango de 15-16 µg/ml. Realizando las mismas diluciones en el sobrenadante de las muestras, claramente se puede apreciar una mayor concentración en la banda que se refiere al peso molecular del péptido ([tabla 7](#), [figura 32](#)).

En todos los casos el valor de r² es igual a uno como se puede apreciar en el perfil realizado.

Péptido sintético y sobrenadante juntos



Resultados

Figura 33. Gel de tricina realizado para el estándar (péptido sintético) y muestras de sobrenadante.

Tabla 8. Perfil densitométrico realizado a las muestras de péptido sintético y sobrenadante.

R-squared value: R ² = 1 Reference Volume: Std1

Volume Analysis

No.	Label	Type	Volume (Int)	Adj. Vol. (Int)	Mean Bkgd. (Int)	Abs. Quant. (ug)	Rel. Quant.	# of Pixels	Min. Value (Int)	Max. Value (Int)	Mean Value (Int)	Std. Dev.	Area (mm ²)
1	U1	Unknown	3,597,286	3,597,286	N/A	75.6	1.01	1,197	2,380	3,190	3,005.3	153.0	13.9
2	U2	Unknown	1,874,032	1,874,032	N/A	39.4	0.53	676	2,380	3,010	2,772.2	102.5	7.8
3	U3	Unknown	5,927,074	5,927,074	N/A	124.6	1.66	2,013	2,225	3,375	2,944.4	259.5	23.4
4	U4	Unknown	5,813,265	5,813,265	N/A	122.2	1.63	1,943	2,427	3,258	2,991.9	173.9	22.6
5	U5	Unknown	3,976,795	3,976,795	N/A	83.6	1.11	1,342	2,663	3,160	2,963.3	120.4	15.6
6	Std1	Standard	3,567,943	3,567,943	N/A	75.0	1.00	1,180	2,722	3,163	3,023.7	103.8	13.7

Para corroborar los resultados anteriores, se realizó una corrida de ambas muestras, en la que se aprecia claramente que la concentración de las muestras (U₃, U₄ y U₅) es mayor a las del estándar (U₁ y std)

DISCUSIÓN.

En los últimos años, se ha invertido mucho tiempo y dinero, para maximizar el rendimiento y la calidad de las proteínas producidas empíricamente en huéspedes heterólogos (Anné y col., 2012).

En este trabajo se sobre-expresó un CAP en un sistema heterólogo. Basados en un estudio minucioso de sus características, tomando en cuenta las propiedades de cada uno de sus aminoácidos, su longitud y carga estequiométrica. Con esto se estableció un sistema de sobre-expresión confiable. A partir de esto se propusieron dos modelos de sobre-expresión en *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS y uno en *Streptomyces lividans* Tk24.

En el primer modelo desarrollado para *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS se trabajó con el péptido B15 sin modificaciones obteniendo un bajo número de transformantes bajo las condiciones descritas en la metodología. Este resultado es debido quizá a la toxicidad propia del péptido sobre la célula huésped, lo que indica que las colonias con el inserto no lograron sobrevivir. Esto se corroboró al aplicar IPTG sobre las transformantes obtenidas, ya que no existió ningún cambio en el crecimiento de las colonias crecidas en el medio de selección e inducidas, indicativo de que las cepas obtenidas poseían el vector, pero no el inserto (figura 10). Al realizar bioensayos de actividad sobre diversos fitopatógenos con el sobrenadante obtenido de estas cepas (figura 11), ningún sobrenadante produjo efecto alguno sobre los fitopatógenos probados. Por lo que, no es posible descartar esta estrategia hasta no comprobar si los resultados se deben a una inducción incorrecta, a que las células transformadas contenían el vector que les proporcionó la resistencia, pero no incluía el inserto y aquellas que lo contenían, no lograron crecer debido a la toxicidad ejercida por el péptido en el medio suplementado con antibiótico o simplemente probando diferentes condiciones de cultivo (figura 9).

Los resultados anteriores nos enfocan a reducir el número de mortandad en las transformantes obtenidas. ¿Cómo?, neutralizándolo o reduciendo su actividad sobre la célula huésped. Es así como nos enfocamos en la segunda estrategia, el modelo de inactivación por bisagra. Ya que, al lograr reprimir la actividad del péptido, existe una alta probabilidad de que el minigen se exprese, obteniendo además grandes ventajas en la producción. (Novagen, 2003).

En esta estrategia, es necesaria la inactivación de las cargas del péptido (evitando con esto la muerte de la célula huésped) encontrando un sistema de expresión apropiado, debido a las características tóxicas del péptido de interés. Atendiendo a esto, se realizaron diferentes modelamientos que se pueden apreciar en las [figuras 12 y 13](#), en ellos se antepone un péptido catiónico a uno aniónico con el fin de neutralizar sus cargas y reducir de esta manera su efecto antimicrobiano sobre la célula huésped. Los modelamientos tuvieron como objetivo, vigilar que el péptido aniónico se mantuviera siempre frente al péptido catiónico evitando así, su actividad. Se encontró un modelo que cumplió con los requisitos necesarios para interactuar con la membrana de la célula huésped, ya que mantuvo una estructura hélice- α estable, los aminoácidos que conformaron la bisagra formaban un bucle que hacía que el péptido complementario quedara frente a B15, con lo que podría inactivar las cargas de sus aminoácidos, sin alterar su estabilidad, ni su forma ([figura 14](#)). La selección del sistema de expresión es para células de *Escherichia coli* BL21(DE₃) pLysS, haciendo uso del plásmido pET17-b, sin embargo, por cuestiones de tiempo esta estrategia no se pudo comprobar.

Se cambió el modelo de expresión y la célula huésped para la tercera estrategia, debido a que en los últimos años se ha demostrado que *Streptomyces lividans* TK24, cuenta con grandes ventajas para sobre-expresar proteínas heterólogas, ya que carece de espacio periplásmico, por lo que secretan al medio las proteínas

producidas facilitando su plegado, purificación y correcta actividad, evitando la acumulación intracelular que provoca la toxicidad sobre el hospedero.

La sustitución de un ácido glutámico por una alanina en la posición 14 potenció la actividad del péptido producido. La correcta elaboración del *cassette* de expresión, que incluyó la fusión del péptido de interés a un péptido señal heterólogo y sus promotores, potenciaron la secreción del péptido en forma activa. La clonación del sistema en un vector de alto número de copias y la transformación de la cepa de interés, brindaron un buen modelo de expresión logrando la producción de un péptido potencialmente tóxico para la célula hospedera de forma rápida, sencilla y a menor costo que otros sistemas de expresión previamente reportados ([Anderson y col., 1991](#); [Callaway y col., 1993](#); [Hara y Yamakawa, 1996](#)).

Debido a los niveles de producción obtenidos en este sistema, se sugiere que el éxito de la tercera estrategia dependió de varios factores, el primero fue la correcta elaboración del *cassette* de expresión, que incluyó la fusión del péptido de interés a un péptido señal heterólogo y sus promotores (*vsi*), con la finalidad de ayudar a una correcta producción y secreción del péptido catiónico, la elección del vector de expresión (pIJ486), para alto número de copias y por supuesto la célula hospedera *Streptomyces lividans* Tk24, que ha sido reportada como un buen modelo de expresión para algunas proteínas heterólogas, el uso de codones de uso preferencial para este microorganismo y la sustitución en la posición 14 de un ácido glutámico, por alanina ([Strøm y col., 2000](#)). Todo esto en conjunto, nos brindó un buen modelo de expresión para el péptido con actividad antimicrobiana, ya que se logró producir y secretar de forma exitosa B15, un péptido potencialmente tóxico para la célula hospedera. Además de realizarse de forma rápida y mucho más sencilla que otros sistemas de expresión previamente reportados ([Anderson y col., 1991](#); [Callaway y col., 1993](#); [Hara y Yamakawa, 1996](#)).

Discusión

Al realizar la comparación de los rendimientos obtenidos con los sistemas reportados hasta el momento (Parachin y col., 2012), se encontró que ninguno ha alcanzado rendimientos tan altos, por lo que puede concluirse que la combinación de factores usados en la estrategia potenció la producción. Debido a que la afinidad de la membrana por una mayor cantidad de péptido depende de la composición lipídica y propiedades fisicoquímicas de la misma, existen diferentes grados de susceptibilidad de una célula por un determinado CAP, al compararlo contra su estándar, queda claro el aumento en la actividad del péptido producido.

Por otro lado, con el fin de descartar que la actividad encontrada se deba a la producción de un metabolito secundario distinto al CAP sobre expresado, se realizaron pruebas de fermentación de las que se encontró que la actividad se muestra a partir de los cuatro días de fermentación, momento en el que no existe producción de metabolitos secundario. Al hacer el fraccionamiento del sobrenadante, la actividad solo se encontró en la fracción mayor a 3 KDa que no corresponde al tamaño de ningún metabolito secundario, ya que los metabolitos secundarios cuentan con un peso molecular que no rebasa los 1.5 KDa.

El péptido secretado tiene amplio espectro en bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y hongos, lo que hace suponer que el péptido alcanza una concentración adecuada, después de acumularse sobre la membrana de los fitopatógenos y de esta forma puede ejercer su actividad. Es necesario considerar que el péptido también es activo en bacterias benéficas para la agricultura, sin embargo, esto se puede sortear encontrando la concentración mínima inhibitoria en cada cepa o en su defecto sustituyéndola una vez controlado el fitopatógeno. En el caso de hongos fitopatógenos su efecto fue menor, esto se puede deber a la reducida interacción entre el péptido y la membrana celular de los hongos.

Con este método de producción de AMPs, no sólo se podría combatir las pérdidas económicas en la agricultura, a costos reducidos; por lo que la contribución de este

Discusión

estudio no se limita a el control de fitopatógenos, sino que su implicación abarca otros sectores como: médico, agrícola, alimenticio, ganadero, etc.

CONCLUSIÓN.

B15 es un péptido catiónico que no se puede expresar de forma directa en *Escherichia coli*, ya que es letal para este microorganismo. Los resultados sugieren la necesidad de un sistema que neutralice esta propiedad y permita su correcta expresión, un sistema diseñado para una cepa de rápido crecimiento. En este estudio se ha propuesto un modelo de inactivación por bisagra (diseñado para *Escherichia coli* BL21 (DE3) *pLysS*, modelo que ha sido sometido a pruebas estructurales, arrojando buenos resultados. Por lo que podría ser un modelo efectivo para sobre-expresar péptidos catiónicos.

El sistema de expresión desarrollado para *Streptomyces lividans* Tk24 cumplió con los objetivos propuestos en este trabajo ya que, en él se logró expresar el péptido de interés. El *casette* de expresión diseñado para este microorganismo se clonó exitosamente en el vector pIJ486, obteniendo un alto porcentaje de transformantes que incluyen la construcción, además se pudo comprobar que las transformantes probadas, producen y secretan el péptido al medio de cultivo (gracias al péptido señal y al promotor que se insertaron en la construcción), obteniendo así un extracto que inhibe el crecimiento de *Bacillus subtilis*, *Collectotrichum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomona aurofaciens*, *Nigrospora oryzae*, *Pseudomonas syringae pv.tomato* *Ralstonia solanacearum* y *Xanthomonas axonopodis pv. Citri*. pudiéndose usar de forma directa sobre los cultivos para contrarrestar a estos fitopatógenos.

RESEARCH ARTICLE

Streptomyces as Overexpression System for Heterologous Production of an Antimicrobial Peptide

Marisol Roldán-Tapia^a, Jozef Anné^b, Ana Gisela Reyes^c, Ulises Carrasco^{2a}, Cesar Millán-Pacheco^d, Javier Barrios-González^{3a} and Armando Mejía^{*4a}

^aDepartment of Biotechnology, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México DF, México, San Rafael Atlixco 186. Col. Vicentina. C.P 09340; ^bRega Institute, Katholieke Universiteit Leuven, Laboratory of Molecular Bacteriology, Minderbroedersstraat 10,B-3000 Leuven, Belgium; ^cConacyt-CIBNOR, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, BCS, México; ^dFacultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Avenida Universidad 1001, CP 62209, Cuernavaca, Morelos, México

Abstract: Defense mechanisms of plants against phytopathogens include cationic antimicrobial peptides (CAPs). The broad-spectrum activity of these peptides has been evaluated previously against different phytopathogens. Their lack of toxicity for plants and animals is a promising feature for pest control. Although, some attempts have been made previously in order to increase their heterologous expressions, the employed strategies have so far proven to be ineffective. Low production yield and elevated costs are the obstacles to overcome. In this study, a strategy for CAP overexpression is presented based on the construction of an expression cassette for *Streptomyces lividans* TK24. This system contains elements that allow the increase of the efficiency of the peptide's expression. The main elements included in this cassette are the sequences of the promoter and signal peptide from a subtilisin inhibitor gene of *Streptomyces venezuelae*. This allows the efficient secretion of the peptide to the growth medium, thereby simplifying its recovery and avoiding its toxic effect on the producing organism. The results obtained demonstrate the system's efficiency by achieving a peptide concentration of 11.61 mg/ml. This represents at least a 10-fold increase compared to previously established strategies.

ARTICLE HISTORY

Received: July 15, 2016
Revised: November 29, 2016
Accepted: February 1, 2017

DOI: 10.2174/0929866524666170208
154327

Keywords: Heterologous production, antimicrobial peptide, *Streptomyces lividans*, secreted peptide.

INTRODUCTION

Recently, the importance of antimicrobial peptides in plant disease control has been widely recognized. They could be used in several fields of application, and large quantities of antimicrobial peptides would be required. However, their production is very expensive; this is why a suitable production method, alternative to traditional chemical synthesis is necessary.

Production of recombinant antimicrobial peptides in prokaryotic systems has demonstrated the viability of this approach. Nevertheless, expression of antimicrobial peptides in *Escherichia coli* is potentially limited due to their toxicity to host cells and susceptibility to proteolytic degradation, although this can be reduced using a fusion protein approach [1]. As an alternative, we describe a successful antimicrobial peptide production system in *S. lividans* which showed to be

effective for the secretion of large quantities of cationic antimicrobial peptides.

Antimicrobial peptides, particularly those of the cationic type (CAPs), affect the plasma membrane of the target organism by inducing both destabilization and stress [2]. Mammalian cells are not affected by these peptides as their membranes contain cholesterol (up to 25%), a predominance of phosphatidylcholine lipids, and an essentially neutral (zwitterionic) outer leaflet [3], which interfere with CAP activity. This selectivity can be exploited in many applications [4, 5]. Additionally, there is a low probability that the exposed microorganisms will develop resistance against CAPs. Unfortunately, although they could be used in several fields of application, including agriculture, their production costs are elevated as the most effective approach so far is by chemical synthesis. In addition, there are heterologous expression strategies using *Escherichia coli* as host [6]. Examples of this approach include the production of cecropin [7, 8], moricin [9], human defensins [10], magainin [11, 12] and concatemers, such as buforin II. In some of these strategies, an attempt has been made to prevent CAP lethality by using recombinant protein technology in order to mask the peptide's intrinsic antimicrobial activity [13]. There are other

*Address correspondence to this author at Department of Biotechnology, Universidad Autónoma Metropolitana San Rafael Atlixco 186, Vicentina, Iztapalapa., P.O. Box: 09340. Ciudad de México, México;
Tel: ++52(55)58046438; Fax: +52(55)58044712;
E-mail: ama@xanum.uam.mx

150 rpm for 24 h. Protoplasts were obtained using a technique previously described by Hopwood [24].

Four plates were prepared containing R₂ medium described by Hopwood [24], supplemented with CuSO₄·5H₂O (2mM-1/1000) and CaCl₂·2H₂O 36.8% (1/100). 10 µl of ligation mixture and 500 µl of PEG6000 35 % (v/v) were added to a tube containing 200 µl of a protoplast suspension (OD600 with a value close to 1). The protoplast suspension and ligation mixture were mixed and incubated at a room temperature (30 °C) for 24 h. Each R₂-plate was inoculated with 150 µl of this transformation mixture. Plates were subsequently incubated at 30 °C for 24 h in order to allow protoplast regeneration. After this period, 50 µg/ml thiostrepton was added and dispersed within the plate. The transformants were allowed to grow for an additional 24 h [8].

2.8. Transformant Selection by Colony PCR

In order to verify that the expression cassette was present in the transformants, colonies were disrupted and their DNA taken as template. A PCR was performed using the conditions and primers reported by Van Dessel, 2003 [28] PCR results were corroborated by automated sequencing. Bioassays were carried out to verify the production of the peptide and its secretion to the growth medium.

2.9. Activity Assays on Bacteria

To rule out that the observed activity originated from a secondary metabolite from *S. lividans* but not the peptide, an ultrafiltration step was performed. Biomass was retrieved from a six day-old culture using quick filtration. The supernatant was collected in Amicon® ultrafiltration units with a regenerated cellulose membrane for proteins lower than 3.0 kDa.

Activity bioassays were carried out using both fractions. As reported by Berghe and Vlietinck (2005) [34], LB plates were inoculated with a spore suspension of the indicator microorganism (*B. subtilis* WT or a phytopatogen) (1x10⁶ CFU). Wells were made and 100 µl of the filtered supernatant was added at different time points during the incubation. Negative (liquid medium) and positive (synthetic peptide 48 µM) controls were also included. Incubation was carried out over 16 h.

2.10. Peptide Identification

The use of Tricine-SDS-PAGE 16% gels with 6M urea was recommended for the separation of peptides within the 1-100 kDa range with a good resolution [35], AB-6 stock acrylamide and loading buffer B were used, and 0.2 µg of peptide. The electrophoretic run was carried out over 120 min at 100 Volts and the proteins were stained with Coomassie blue. Gels were scanned and the images were analyzed in a photo document system (Gel Doc™ EZ, Bio-Rad) in order to generate a densitometric profile of the bands.

Experiments were performed in triplicate and repeated three times. The standard deviation was always lower than 2%.

3. RESULTS

The simulation of the helix showed that the peptide is stable along 100 ns at 37°C. The simulation showed that there exists a region particularly stable between residues 3 to 11 (FKCRRWQWRMCKLEA). The backbone RMSD of all the peptide along the time (calculated each ns) was of 2.49 +/- 0.52 Å and for those residues 3 to 11 was of 0.62 +/- 0.4 Å. Figure 1 shows the changes that occurred on two snapshots of the simulations.

Based on these results, we assumed that the peptide might conserve the helical conformation along time so the peptide was chemically synthesized and its activity was assessed observing a broad spectrum against phytopathogenic bacteria and fungi (Table 2).



Figure 1. Initial model (C-score of -0.01 and 0.71+0.11 of TM.) on white, structure after 77 ns with the higher backbone RMSD over the residues 3-11 of 2.1 Å (middle gray) and final structure after 100 ns with a backbone RMSD over the same residues of 0.58 Å (darker gray).

Table 2. Activity of the peptide. Growth inhibition percentage (%) (optical density at 600 nm).

Microorganism	Synthetic peptide	Produced peptide	Taxon
<i>Collectotrichum sp.</i>	5.83%	5.36%	Fungi
<i>Fusarium oxysporum</i>	6.31%	5.81%	Fungi
<i>Fusarium solani</i>	7.00%	6.24%	Fungi
<i>Nigrospora oryzae</i>	57.84%	52.21%	Fungi
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	67.42%	62.03%	Bacteria
<i>Pseudomonas syringae pv.tomato</i>	19.29%	17.75%	Bacteria
<i>Ralstonia solanacearum</i>	12.48%	11.18%	Bacteria
<i>Xanthomonas axonopodis pv. citri</i>	79.52%	73.06%	Bacteria

2

systems, such as transgenic mouse erythrocytes for magainin production and recombinant hybrid production, such as the cecropin and magainin peptide in *Pichia pastoris* [14]. Unfortunately, these strategies have limitations such as low yield [7, 9] and proteolysis of the fusion protein that masks its toxic properties [15]. Additionally, when these strategies are employed, the cytoplasmic accumulation of the expressed proteins in the form of inclusion bodies is frequently observed [16], inducing activity inhibition and rendering the purification process difficult. Consequently, this is reflected in low yield values [17].

Therefore, as a solution to the difficulties for heterologous expression of CAP we demonstrate efficient production by *Streptomyces lividans*

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Peptide Modelling and Simulations

For the construction of the CAP, Glu was substituted by Ala at the 14th position of the original sequence (Phe-Lys-Cys-Arg-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg-Met-Lys-Lys-Leu-Glu-Ala). The initial model was built using iTasser server [18, 19]. The model was immersed in a cubic box of water TIP3P with a concentration of KCl 0.15 M using charmm-gui web server (<http://www.charmm-gui.org>) [20]. All molecular dynamics simulations were performed using the GROMACS 5.0.5 [21, 22] software using charmm 36 parameters [23] with the gromacs inputs as suggested by charmm-gui server. The simulations were run by 100 ns at 37°C, 1 atm of pressure and periodic boundary conditions.

2.2. Strains, Plasmids Constructions, Media and Growth Conditions

The following phytopathogens were used in this research: *Collectotrichum* sp, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Nigrospora oryzae*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas syringae* pv. tomato, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas axonopodis* pv. Citri and *Bacillus subtilis*. All of them were provided by Química Agronómica de México, S. de R.L. M.I. Culture media preparation were performed according to [24] and [25].

2.3. DNA Manipulations

Molecular biology techniques were performed according to [24] and [25]. Restriction endonucleases and DNA modifying enzymes were provided by Invitrogen and Promega. PCR reactions were carried out using the primers reported by Van Dessel, 2003 [28] employing the GoTaq Flexi DNA polymerase.

2.4. CAP Selection

The standard peptide was synthesized by Thermo Fisher Scientific de México (Invitrogen) with a 50% purity and it was stored at -20°C.

The selected CAP is a broad-spectrum cationic peptide that has been reported as non-toxic for plants and animals. Its activity was evaluated through serial dilutions (1×10^{-1} to

Table 1. Strains and plasmids used.

Strain	Genotype	Reference
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>F endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZAM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_{λ}^c m_{λ}^c), λ^-</i>	Grant, 1990 [26]
<i>Streptomyces lividans</i> TK24	<i>str-6</i> SLP2- SLP3-	Kieser, 2000 [27]
Plasmid	Characteristics	Reference
pIJ486b	Vector from pIJ10, like pIJ487 but with opposite orientation of the fragment <i>Bgl</i> II containing the cloning sites.	Kieser, 2000 [27]

1×10^{-6}) and performing bioassays on different pathogens by assessing optical density (OD) at 600 nm [29]. Liquid LB medium was used to culture these bacteria and the incubations were carried out at 37°C. Results were expressed as the inhibition percentage of bacterial growth mediated by the peptide's activity (Figure 3).

2.5. Design of Expression Cassette

For the construction of the cassette, preferential codons were used for *S. lividans* with G and C at the third position [30]. The peptide of interest was fused to the *vsj* promoter and signal sequence (*vsj-ss*) of the subtilisin inhibitor from *Streptomyces venezuelae* CBS762.70, which is a signal peptide with a proven high secretion efficiency [31, 32]. The *vsj* promoter displays a superior transcription initiation of 1.5 and 1.9-fold compared to the *aph* and *ermEp** promoters, respectively [33].

The cloning vector used was pIJ486, which is derived from the pIJ101 plasmid including a transcription terminator sequence and a thiostrepton resistance marker.

2.6. Minigene Amplification and Cloning in *Streptomyces lividans* TK24

Based on the cassette designed in silico, the subcloned minigene was synthesized in the PIDT-smart vector which was amplified by transforming *Escherichia coli* DH5 α through electroporation. The fragment was digested using the *Bam*H1 and *Hind*III restriction enzymes and cloned into the pIJ486 vector to finally be used to transform protoplasts of *S. lividans* TK24 [24].

2.7. *S. lividans* TK24 Protoplast Transformation

Biomass was obtained from a 48 h preculture of *S. lividans* TK24 grown in YEME medium for 48 h and incubated at 30 °C and 150 rpm. A flask containing 250 ml of S medium, was added 50 ml of glucose solution (66.6 mg/ml) and 12.64 ml of glycine 20%. Then was inoculated with 503 of fragmented mycelium, which was incubated at 30°C and

4

3.1. CAP Production System

By using preferential codons for *S. lividans* TK24 and taking into account the considerations previously described in the Methods section, an expression cassette was developed as shown in Fig 2.

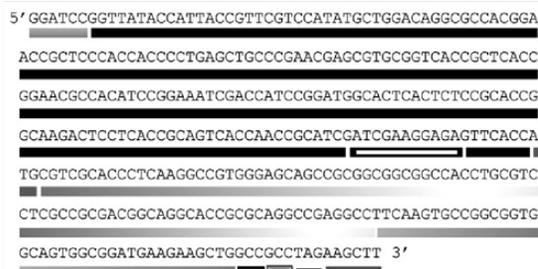


Figure 2. Expression cassette for *S. lividans* TK24. Restriction site, promoter, Shine-Dalgarno sequence, start codon, signal peptide, peptide of interest, modified amino acid, stop codon.

From the subcloning into pIDT-Smart, this expression cassette was cloned into the pIJ486 vector to finally transform protoplasts of *S. lividans* TK24. The transformation was verified by colony PCR, using primers complementary to the multiple cloning site within the pIJ486 vector for amplification of the fragments as reported by Van Dessel, 2003 [28].

DNA sequencing was performed using the purified material obtained from the bands in the agarose gel. Results showed 100% identity between the amplified region and the oligonucleotide sequence of the designed expression cassette.

3.2. Activity Assays on Bacteria

Peptide production was evaluated in a Petri dish using the cover bioassay. On the surface of these bioassay dishes, a halo of inhibition was observed, resulting from the secreted peptide by the transformant. It was verified that no activity was obtained from the parental strain.

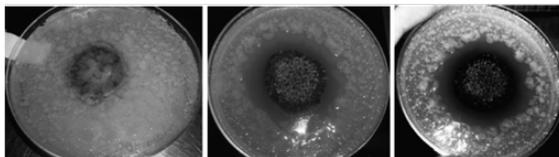


Figure 3. Cover bioassay. Left: Parental strain with *B. subtilis*, Center: Transformant with *B. subtilis*, Right: Transformant with *Xanthomonas* phytopathogen.

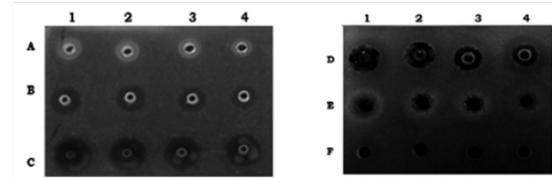


Figure 4. Diffusion bioassay. Line A, Concentration curve of the synthetic peptide (0.0132, 0.0099, 0.0066 and 0.0033 mg/μl); Lines B and C, supernatant activity after six days of fermentation (200, 180, 150, 100 μl); Line D, activity of the fraction above 3 kDa; Line E, growth of the fraction lower than 3 kDa and Line F, activities of the supernatants from the parental strain.

The results suggest that CAP is actively secreted into the culture medium because of the signal peptide, as previously demonstrated by other studies in which it was secreted through the Sec pathway [31, 32]. In order to verify this, a cell culture fractionation was performed on a six day-old fermentation in which the biomass was removed through quick filtration. The supernatant was collected in Amicon® ultrafiltration units of 3.0 kDa, obtaining two fractions: one superior to 3 kDa and another one below this value. Considering that the peptide has an average mass of 3.51 kDa, it should be located in the fraction superior to 3.0 kDa.

The figure shows the inhibition of the indicator microorganism with the fraction superior to 3.0 kDa. This effect was absent in the fraction lower than 3.0 kDa.

Performing different diffusion bioassays, a peptide standard curve was constructed and the quantification of the produced peptide was achieved, obtaining a concentration of 11.6 g/l.

In addition, the effect of the peptide on the producer microorganism, *S. lividans*, was also measured. The results showed a slight negative effect on growth in the diffusion bioassay. These results suggest this sensitivity could be the reason why the peptide production stopped in the transformant strain of *S. lividans*.

3.3. Peptide Identification

In order to identify the peptide, Tricine-SDS-PAGE gels were prepared for fragment separation through vertical electrophoresis. The separation range in these gels is 1-100 kDa.

The acquired images of the Tricine-SDS-PAGE gels were analyzed in a photo documentation system (Gel Doc™ EZ Bio-Rad) in order to generate a densitometric profile of the bands. Thus, a second quantification of the produced peptide was carried out, obtaining a result of 11.61 mg/ml. Therefore, the quantification results obtained from the bioassay were corroborated.

DISCUSSION

During the last years, considerable efforts were made in order to maximize the yield and quality of the proteins produced in heterologous systems [17]. This is even more critical in the case of peptides or proteins that are potentially

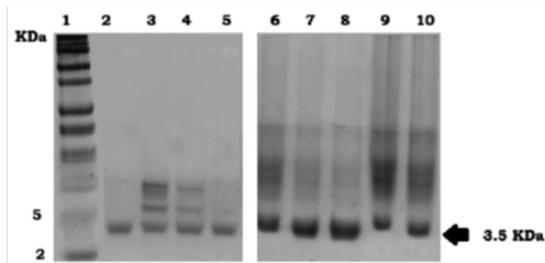


Figure 5. Tricine-SDS-PAGE. 4% stacking gel, 10% spacing gel and 16% separating gel with 6M urea and stained with Coomassie blue. Lane 1: molecular weight marker; lanes 2- 5: synthetic peptide; lanes 6-10: samples from the transformant growth media.

toxic for the producing organism. Thus, the aim of this study was to achieve the overexpression of a CAP. The strategy employed was the design of a specific system using a selected CAP with known properties regarding its amino acid sequence, size, stoichiometric charge, reliability parameters such as the C-score, structural similarity parameters (RMSD) and topological measurements (TM-score). The presence of hydrophobic and positively-charged amino acids are important for CAP activity and it has been reported that the substitution of a glutamic acid for alanine frequently results in improved activity [36, 37]. Taking this into account, it was confirmed that by modifying the amino acid sequence, specifically substituting Glu for Ala in the 14th position, results in enhanced toxicity. This offers a reliable and stable model.

Regarding the production strain, (*Streptomyces lividans*) it does not possess a periplasmic space. Thus, the produced proteins are secreted into the growth medium, simplifying their folding, purification and proper activity. This also contributes to prevent its intracellular accumulation that normally has toxic effects on the host.

During the construction of the expression cassette the use of preferential codons in *Streptomyces* [30, 38], was considered. The promoter of the parental strain was exchanged for the *S. venezuelae* *vsj* sequence that, according to previous reports, has displayed a high efficiency [31-33]. The replicative vector pIJ486 was selected, which includes a transcription terminator sequence [39] and resistance to thiostrepton as a selection marker. The Shine-Dalgarno sequence was located [40]. The start codon was ATG in order to provide a correct RNA translation and stability.

Finally, the secretion pathway of the produced peptide was considered. Two of these have been described in *Streptomyces* sp: the Sec and Tat pathways. In this study, the former was selected for peptide excretion. The proteins in this pathway contain a signal peptide that is eventually removed by a Type I signal peptidase (Spase). These are essential for cell viability and their elimination leads to the accumulation of precursor proteins in cell membranes, and subsequently to cell death [41, 42]. *S. lividans* possesses four Type I SPases: W, X, Y, Z [43-45]. This pathway might be the underlying cause of the system's efficiency regarding CAP secretion, cell death evasion and the prevention of the toxic effect on

the host microorganism, in comparison to other expression systems previously reported [7-9, 46].

Regarding the secreted cationic peptide, it displayed a broad-spectrum activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria as well as fungi. The effect is variable depending on the affinity of the membrane towards the peptide, its lipid composition and its physicochemical properties. According to several authors, peptide concentration is also an important factor related to its effectiveness when acting on the membrane of the target microorganism [47-51]. The effect was less pronounced on fungi, probably because of the decreased interaction between the peptide and their cell membrane [12, 52, 53].

Using the described system for CAP production, it is possible to produce efficiently, an interesting metabolite to handle phytopathogens in agriculture at low costs. Additionally, its application could be used in other fields such as medical, food industry, stockbreeding, etc.

CONFLICT OF INTEREST

Authors thank to the following sources of founding: Marisol Roldán-Tapia, UAM-I, CONACYT (no. 332832); Armando Mejía, UAM-I; Jozef Anné, Rega Institute, KUL; Ana Gisela Reyes, UAM-I; Ulises Carrasco, UAM-I; Cesar Millán-Pacheco, UAM-I; Javier Barrios-González, UAM-I

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Alejandra Serrato Díaz from Divisional Laboratory of Molecular Biology (UAM) for her technical help. Authors also gratefully acknowledges to the UAM Super Computer Center (UAM-Iztapalapa) Aitzalao and Yoltla.

REFERENCES

- [1] Yalin Y., Z.T., Da T., Jun Z., Jiarong W., Jianhua W., *High-level production of a candidacidal peptide lactoferrampin in Escherichia coli by fusion expression*. J. Biotech, **2009**. 139(4): p. 326-331.
- [2] Marcos *et al.*, M.A., Pérez-Payá E, Misra S, López -García Belén, *Identification and Rational Design of Novel Antimicrobial Peptides for Plant Protection*. Annu Rev Phytopathol., **2008**. **46**: p. 273-301.
- [3] Verkleij *et al.*, Z.R., Roelofs B, Comfurius P, Kastelij D and Van Deenen L. , *The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane. A combined study using phospholipases and freeze-etch electron microscopy*. Biochim Biophys Acta., **1973**. **323**: p. 178-193.
- [4] Sahl, P.a., *The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance*. Nat. Rev. Microbiol. , **2006**. **4**: p. 529-536.
- [5] Yount, Y.a., *Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance*. Pharmacol Rev., **2003**. **55**: p. 27-55.
- [6] Li., *Recombinant production of antimicrobial peptides in Escherichia coli: a review*. Protein expr purif., **2011**. **80**(2): p. 260-267.
- [7] Andersons, D.E., A.; Josephson, S.; Hansson, L.; Steiner, H. , *Biologically active and amidated cecropin produced in a baculovirus expression system from a fusion construct containing the antibody-binding part of protein A*. Biochem J **1991**. **280**: p. 219-224.
- [8] Callaway *et al.*, L.J., Haselbeck B, Baltaian M, Bonnesen SP, Weickmann J, Wilcox G, Lei SP, *Modification of the C terminus of cecropin is essential for broad-spectrum antimicrobial activity*. Antimicrob Agents Chemother., **1993**. **37**: p. 1614-1619.
- [9] Hara, S.Y., M. , *Production in Escherichia coli of moricin, a novel type antibacterial peptide from the silkworm, Bombyx mori*. Biochem Biophys Res Commun, , **1996**, **220**(3), : p. 664-669. .

- [10] Xu *et al.*, W.F., Peng L, Fang X, Cen P *Expression of human beta-defensin-2 with multiple joined genes in Escherichia coli*. Appl Biochem Biotechnol., 2005. **120**(1): p. 1-13.
- [11] Lee *et al.*, H.S., Kim S.C., *Expression of an antimicrobial peptide magainin by a promoter inversion system*. J Microbiol Biotechnol., 1998. **8**: p. 34-41.
- [12] Sharma *et al.*, K.-C.A., White SP, Dhanjal NK, Huang W, Paulhiac C, Friedman EJ, Manjula BN, Kumar R, *High-efficiency synthesis of human alpha-endorphin and magainin in the erythrocytes of transgenic mice: a production system for therapeutic peptides*. Proc Natl Acad Sci USA, 1994. **91**(20): p. 9337-9341.
- [13] Lee *et al.*, M.I., Park CB, Kim SC *Acidic peptide-mediated expression of the antimicrobial peptide buforin II as tandem repeats in Escherichia coli*. Protein Expr Purif. , 1998. **12**: p. 53-60.
- [14] Fengliang *et al.*, X.X., Liexi Wang, Wenqing Zhang, Dexiang Gu, *Expression of recombinant hybrid peptide cecropinA(1-8)-magainin2(1-12) in Pichia pastoris: Purification and characterization*. Protein Expr Purif., 2006. **50**: p. 147-156.
- [15] Piers *et al.*, B.M., Hancock RE *Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria*. Gene, 1993. **134**: p. 7-13.
- [16] Pimienta *et al.*, F.R., Sánchez JC, Vallín C, *Secretion of human interferon alpha 2b by Streptomyces lividans*. Appl Microbiol Biotechnol., 2002. **58**: p. 189-194.
- [17] Anné, J.M., B.; Van Impe, J.; Van Mellaert, L., *Recombinant protein production and streptomycetes*. J. Biotech., 2012. **158**(4): p. 159-167.
- [18] Roy, A.K., A.; Zhang, Y. , *I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction*. Nature Protocols, , **2010**, **5**(4): p. 725-738. .
- [19] Zhang, Y., *I-TASSER server for protein 3D structure prediction*. . BMC Bioinformatics, , **2008**, **9**(11): p. 40.
- [20] Jo, S.K., T.; Iyer, V. G.; Im, W., *CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM*. . Journal of Computational Chemistry, **2008**, **29**(11): p. 1859-1865. .
- [21] Van Der Spoel, D.L., E.; Hess, B.; Groenhof, G.; Mark, A. E.; Berendsen, H. J. C, *GROMACS: fast, flexible, and free*. . Journal of Computational Chemistry, **2005**, **26**(16): p. 1701-1718.
- [22] Abraham, M.J.M., T.; Schulz, R.; Páll, S.; Smith, J. C.; Hess, B.; Lindahl, E, *GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers*. SoftwareX, **2015**, **1-2**: p. 19-25. .
- [23] MacKerell, J., A. D.; Banavali, N.; Foloppe, N. , *Development and current status of the CHARMM force field for nucleic acids*. Biopolymers, **2001**, **56**: p. 257-65.
- [24] Hopwood *et al.*, B.M., Chater KF, Kieser T, Bruton CJ, Kieser HM, Lydiate DJ, Smith CP, Ward JM, Schrepf H., *Genetic manipulation of Streptomyces: A laboratory manual*. 1985, John Innes Foundation.: Norwich, CT.
- [25] Sambrook *et al.*, F.E., Maniatis T *Molecular cloning: A laboratory manual in Cold Spring Harbor Laboratory*. 1989: Cold Spring Harbor, N.Y.
- [26] Grant., *E.coli Genotypes*. 1990.
- [27] Kieser *et al.*, T., Bib, M., Buttner, M., Chater, K., Hopwood, D., *Practical Streptomyces Genetics*. , ed. T.J.I. Foundation. 2000, Norwich.
- [28] Van Dessel *et al.*, V.M.L., Geukens N, Anné J, *Improved PCR-based method for the direct screening of Streptomyces transformants* J Microbiol Methods, 2003. **53**(3): p. 401-403.
- [29] Stevens *et al.*, S.B., Klapes NA, Klienhammer TR, *Nisin treatment for inactivation of Salmonella species and other gram-negative bacteria*. App Environ Microbiol., 1991. **57**: p. 3613-3615.
- [30] Wright, F.B., M.J. , *Codon usage in the G+C-rich Streptomyces genome*. . Gene, , **1992**, **113**: p. 55-65.
- [31] Lammertyn *et al.*, D.S., Schacht S, Van Mellaert L, Anné J *Influence of charge variation in the Streptomyces venezuelae alpha-amylase signal peptide on heterologous protein production by Streptomyces lividans*. Appl Microbiol Biotechnol., 1998. **49**(424-430).
- [32] Lammertyn *et al.*, V.M.L., Schacht S, Dillen C, Sablon E, Van Broekhoven A, *Evaluation of a novel subtilisin inhibitor gene and mutant derivatives for the expression and secretion of mouse tumor necrosis factor alpha by Streptomyces lividans*. Appl Environ Microbiol., 1997. **63**: p. 1808-1813.
- [33] Van Mellaert *et al.*, L.E., Schacht S, Proost P, Van Damme J, Wroblowski B, *Molecular characterization of a novel subtilisin inhibitor protein produced by Streptomyces venezuelae CBS762.70*. DNA Seq., 1998. **9**: p. 19-30.
- [34] Bergher, P., *Antiviral botanicals in herbal medicine*. Med. Herb., 2005. **14**: p. 1-12.
- [35] Schägger., *Protocol: Tricine-SDS-PAGE*. Nat Protoc., 2006. **1**: p. 16 - 22
- [36] Strøm *et al.*, S.W., Svendsen JS, Rekdal Ø, *Increased antibacterial activity of 15-residue murine lactoferricin derivatives*. J Pept Res., 2001. **57**: p. 127-139.
- [37] Strøm *et al.*, S.J., Rekdal Ø, *Antibacterial activity of 15-residue lactoferricin derivatives*. . J Pept Res., 2000. **56**: p. 265-274.
- [38] Ueda *et al.*, T.S., Nishiyama KI, Kumagai I, Miura KI *Effect of a rare leucine codon, TTA, on expression of a foreign gene in Streptomyces lividans*. Biochim Biophys Acta., 1993. **1172**: p. 262-266.
- [39] Pulido, D.J., A. , *Optimization of gene expression in Streptomyces lividans by a transcription terminator*. Nucleic Acids Res, , **1987**, **15**(10), : p. 4227-4240. .
- [40] Strohl., *Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters*. . Nucl Acids Res., 1992. **20**(5): p. 961-974.
- [41] Dalbey *et al.*, L.M., Bron S y van Dijl JM *The chemistry and enzymology of the type I signal peptidases*. Protein Sci. , 1997. **6**: p. 1129-1138.
- [42] Koshland *et al.*, S.R., Botstein D *Diverse effects of mutations in the signal sequence on the secretion of beta-lactamase in Salmonella typhimurium*. Cell, 1982. **30**: p. 903-914.
- [43] Parro, V.M., R.P. , *A new signal peptidase gene from Streptomyces lividans TK21*. . DNA Seq., 1998, **9**, : p. 71-77. .
- [44] Parro *et al.*, S.S., Anne J, Mellado RP *Four genes encoding different type I signal peptidases are organized in a cluster in Streptomyces lividans TK21*. Microbiology, 1999. **145**: p. 2255-2263.
- [45] Schacht *et al.*, V.M.L., Lammertyn E, Tjalsma H, van Dijl JM, Bron S., *The Sip (Sli) gene of Streptomyces lividans TK24 specifies an unusual signal peptidase with a putative C-terminal transmembrane anchor*. . DNA Seq., 1998. **9**: p. 79-88.
- [46] Parachin *et al.*, M.K., Viana AA, Dias SC, Franco OL. , *Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides*. Peptides, 2012. **38**(2): p. 446-456.
- [47] Hwang, *Action of antimicrobial peptides: two-state model*. Biochemistry 2000. **39**: p. 1-6.
- [48] Matsuzaki, *Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1376**.
- [49] Matsuzaki *et al.*, S.K., Fshibe N *Relation ship of membrane curvature to the formation of pores by magainin 2*. Biochemistry, 1998. **37**: p. 11856-11863.
- [50] Nes, N.-M.a., *Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: Their function, structure, biogenesis and mechanism of action*. Arch Microbiol., 1997. **167**(2-3): p. 67-77.
- [51] Shai, *Mode of action of membrane active antimicrobial peptides*. Pept Sci., 2002. **66**(4): p. 236-248.
- [52] Hancock, R.E.W., Lehrer, R. , *Cationic peptides: a new source of antibiotics*. . Trends in Biotechnol, , **1998**, **16**, : p. 82-88. .
- [53] Nakashima *et al.*, M.Y.a.T.T., *Actinomycetes as host cells for production of recombinant proteins*. Microb cell Fact, 2005. **4**(1): p. 7.

- [10] Xu *et al.*, W.F., Peng L, Fang X, Cen P *Expression of human beta-defensin-2 with multiple joined genes in Escherichia coli*. Appl Biochem Biotechnol., 2005. **120**(1): p. 1-13.
- [11] Lee *et al.*, H.S., Kim SC., *Expression of an antimicrobial peptide magainin by a promotor inversion system*. J Microbiol Biotechnol., 1998. **8**: p. 34-41.
- [12] Sharma *et al.*, K.-C.A., White SP, Dhanjal NK, Huang W, Paulhiac C, Friedman EJ, Manjula BN, Kumar R, *High-efficiency synthesis of human alpha-endorphin and magainin in the erythrocytes of transgenic mice: a production system for therapeutic peptides*. Proc Natl Acad Sci USA, 1994. **91**(20): p. 9337-9341.
- [13] Lee *et al.*, M.I., Park CB, Kim SC *Acidic peptide-mediated expression of the antimicrobial peptide buforin II as tandem repeats in Escherichia coli*. Protein Expr Purif., 1998. **12**: p. 53-60.
- [14] Fengliang *et al.*, X.X., Liexi Wang, Wenqing Zhang, Dexiang Gu, *Expression of recombinant hybrid peptide cecropinA(1-8)-magainin2(1-12) in Pichia pastoris: Purification and characterization*. Protein Expr Purif., 2006. **50**: p. 147-156.
- [15] Piers *et al.*, B.M., Hancock RE *Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria*. Gene, 1993. **134**: p. 7-13.
- [16] Pimienta *et al.*, F.R., Sánchez JC, Vallin C, *Secretion of human interferon alpha 2b by Streptomyces lividans*. Appl Microbiol Biotechnol., 2002. **58**: p. 189-194.
- [17] Anné, J.M., B.; Van Impe, J.; Van Mellaert, L., *Recombinant protein production and streptomycetes*. J. Biotech., 2012. **158**(4): p. 159-167.
- [18] Roy, A.K., A.; Zhang, Y., *I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction*. Nature Protocols, , 2010. **5**(4): p. 725-738.
- [19] Zhang, Y., *I-TASSER server for protein 3D structure prediction*. BMC Bioinformatics, , 2008. **9**(11): p. 40.
- [20] Jo, S.K., T.; Iyer, V. G.; Im, W., *CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM*. Journal of Computational Chemistry, 2008. **29**(11): p. 1859-1865.
- [21] Van Der Spoel, D.L., E.; Hess, B.; Groenhof, G.; Mark, A. E.; Berendsen, H. J. C., *GROMACS: fast, flexible, and free*. Journal of Computational Chemistry, 2005. **26**(16): p. 1701-1718.
- [22] Abraham, M.J.M., T.; Schulz, R.; Páll, S.; Smith, J. C.; Hess, B.; Lindahl, E., *GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers*. SoftwareX, 2015. **1-2**: p. 19-25.
- [23] MacKerell, J., A. D.; Banavali, N.; Foloppe, N., *Development and current status of the CHARMM force field for nucleic acids*. Biopolymers, 2001. **56**: p. 257-65.
- [24] Hopwood *et al.*, B.M., Chater KF, Kieser T, Bruton CJ, Kieser HM, Lydiate DJ, Smith CP, Ward JM, Schrepf H., *Genetic manipulation of Streptomyces: A laboratory manual*. 1985, John Innes Foundation.: Norwich, CT.
- [25] Sambrook *et al.*, F.E., Maniatis T *Molecular cloning: A laboratory manual in Cold Spring Harbor Laboratory*. 1989: Cold Spring Harbor, N.Y.
- [26] Grant., *E.coli Genotypes*. 1990.
- [27] Kieser *et al.*, T., Bib, M., Buttner, M., Chater, K., Hopwood, D., *Practical Streptomyces Genetics*, ed. T.J.I. Foundation. 2000, Norwich.
- [28] Van Dessel *et al.*, V.M.L., Geukens N, Anné J, *Improved PCR-based method for the direct screening of Streptomyces transformants* J Microbiol Methods, 2003. **53**(3): p. 401-403.
- [29] Stevens *et al.*, S.B., Klapes NA, Klaenhammer TR, *Nisin treatment for inactivation of Salmonella species and other gram-negative bacteria*. App Environ Microbiol., 1991. **57**: p. 3613-3615.
- [30] Wright, F.B., MJ., *Codon usage in the G+C-rich Streptomyces genome*. Gene, , 1992, . **113**, : p. 55-65.
- [31] Lammertyn *et al.*, D.S., Schacht S, Van Mellaert L, Anné J *Influence of charge variation in the Streptomyces venezuelae alpha-amylase signal peptide on heterologous protein production by Streptomyces lividans*. Appl Microbiol Biotechnol., 1998. **49**(424-430).
- [32] Lammertyn *et al.*, V.M.L., Schacht S, Dillen C, Sablon E, Van Broekhoven A, *Evaluation of a novel subtilisin inhibitor gene and mutant derivatives for the expression and secretion of mouse tumor necrosis factor alpha by Streptomyces lividans*. Appl Environ Microbiol., 1997. **63**: p. 1808-1813.
- [33] Van Mellaert *et al.*, L.E., Schacht S, Proost P, Van Damme J, Wroblewski B, *Molecular characterization of a novel subtilisin inhibitor protein produced by Streptomyces venezuelae CBS762.70*. DNA Seq., 1998. **9**: p. 19-30.
- [34] Bergher, P., *Antiviral botanicals in herbal medicine*. Med. Herb., 2005. **14**: p. 1-12.
- [35] Schägger., *Protocol: Tricine-SDS-PAGE*. Nat Protoc., 2006. **1**: p. 16 - 22
- [36] Strøm *et al.*, S.W., Svendsen JS, Rekdal Ø, *Increased antibacterial activity of 15-residue murine lactoferricin derivatives*. J Pept Res., 2001. **57**: p. 127-139.
- [37] Strøm *et al.*, S.J., Rekdal Ø, *Antibacterial activity of 15-residue lactoferricin derivatives*. J Pept Res., 2000. **56**: p. 265-274.
- [38] Ueda *et al.*, T.S., Nishiyama KI, Kumagai I, Miura KI *Effect of a rare leucine codon, TTA, on expression of a foreign gene in Streptomyces lividans*. Biochim Biophys Acta., 1993. **1172**: p. 262-266.
- [39] Pulido, D.J., A., *Optimization of gene expression in Streptomyces lividans by a transcription terminator*. Nucleic Acids Res, , 1987, . **15**(10), : p. 4227-4240.
- [40] Strohl., *Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters*. Nucl Acids Res., 1992. **20**(5): p. 961-974.
- [41] Dalbey *et al.*, L.M., Bron S y van Dijl JM *The chemistry and enzymology of the type I signal peptidases*. Protein Sci. , 1997. **6**: p. 1129-1138.
- [42] Koshland *et al.*, S.R., Botstein D *Diverse effects of mutations in the signal sequence on the secretion of beta-lactamase in Salmonella typhimurium*. Cell, 1982. **30**: p. 903-914.
- [43] Parro, V.M., R.P., *A new signal peptidase gene from Streptomyces lividans TK21*. DNA Seq., 1998. **9**, : p. 71-77.
- [44] Parro *et al.*, S.S., Anne J, Mellado RP *Four genes encoding different type I signal peptidases are organized in a cluster in Streptomyces lividans TK21*. Microbiology, 1999. **145**: p. 2255-2263.
- [45] Schacht *et al.*, V.M.L., Lammertyn E, Tjalsma H, van Dijl JM, Bron S., *The Sip (Sli) gene of Streptomyces lividans TK24 specifies an unusual signal peptidase with a putative C-terminal transmembrane anchor*. DNA Seq., 1998. **9**: p. 79-88.
- [46] Parachin *et al.*, M.K., Viana AA, Dias SC, Franco OL., *Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides*. Peptides, 2012. **38**(2): p. 446-456.
- [47] Hwang, *Action of antimicrobial peptides: two-state model*. Biochemistry 2000. **39**: p. 1-6.
- [48] Matsuzaki, *Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1376**.
- [49] Matsuzaki *et al.*, S.K., Fshibe N *Relation ship of membrane curvature to the formation of pores by magainin 2*. Biochemistry, 1998. **37**: p. 11856-11863.
- [50] Nes, N.-M.a., *Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: Their function, structure, biogenesis and mechanism of action*. Arch Microbiol., 1997. **167**(2-3): p. 67-77.
- [51] Shai, *Mode of action of membrane active antimicrobial peptides*. Pept Sci., 2002. **66**(4): p. 236-248.
- [52] Hancock, R.E.W., Lehrer, R., *Cationic peptides: a new source of antibiotics*. Trends in Biotechnol., 1998. **16**, : p. 82-88.
- [53] Nakashima *et al.*, M.Y.a.T.T., *Actinomycetes as host cells for production of recombinant proteins*. Microb cell Fact, 2005. **4**(1): p. 7.

REFERENCIAS

- Agrios, G.N. (1988). Plant Pathology. Third Edition. Academic Press. New York. 803 pP. 790–796.
- Andersons D, Engstrom A, Josephson S, Hansson L, Steiner H (1991) Biologically active and amidated cecropin produced in a *baculovirus* expression system from a fusion construct containing the antibody-binding part of protein A. *Biochem J* 280(1): 219–224.
- Anné J, M. B., Van Impe J, Van Mellaert L. (2012). "Recombinant protein production and *streptomyces*." *Journal of Biotechnology* 158(4): 159-167.
- Bals R (2000). Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res* 1: 141-50.
- Bauer A W, Kirby W M, Sherris J C, Turck M (1966). Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 45: 493-496.
- Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417: 141-147.
- Berghe V, Vlietinck J. (1991). Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. *Methods in plant biochemistry.* 6:47-58.
- Binnie C, Cossar JD y Stewart DI (1997). Heterologous biopharmaceutical protein expression in *Streptomyces*. *Trends Biotechnol*, 15: 315-320.
- Birchler T, Reinhart S, Büchner K, Loeliger S, Reinhard S, Hossle P, Aguzzi A, Launer R (2001). Human Toll-like receptor mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin 2 in response to bacterial lipoprotein. *Eur J Immunol* 31: 3131-3137.
- Boman HG (1996). Peptide antibiotics: holy or heretic grails of innate immunity? *Scand. J. Immunological.* 43: 475-482.
- Boman HG (2000). Innate immunity and the normal microflora. *Immunological Rev.* 173: 5-16.
- Boman HG, Agerberth B, Boman A (1993). Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infect Immun* 61: 2978-2984.

Referencias

Breukink, E. & de Kruijff, B (2006). Lipid II as a target for antibiotics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 321–332.

Brodgen KA (2005). Antimicrobial Peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 3:238-250.

Broekaert WF, Cammue BPA, De Bolle MF, Thevissen K, De Samblanx GW, Osborn RW (1997). Antimicrobial peptides from plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 16: 297–323.

Broekaert WF, Terras FRG, Cammue BPA, Vanderleyden J (1990). An automated quantitative assay for fungal growth-inhibition. *FEMS Microbiol Lett.* 69: 55–59.

Callaway JE, Lai J, Haselbeck B, Baltaian M, Bonnesen SP, Weickmann J, Wilcox G, Lei SP (1993) Modification of the C terminus of cecropin is essential for broad-spectrum antimicrobial activity. *Antimicrob Agents Chemother* 37(8):1614–1619

Chan DI, Prenner EJ, Vogel HJ (2006). Tryptophan-and argininerich antimicrobial peptides: structures and mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta* 1758: 1184-1202.

Chater KF (1993). Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annu Rev Microbiol* 47: 685-713.

Dagan A, Efron L, Gaidukov L, Mor A, Ginsburg H (2002). In vitro *antiplasmodium* effects of dermaseptin S4 derivatives. *Antimicrob Agents Chemother.* 46: 1059–1066.

Dalbey RE y Wickner W (1985). Leader peptidase catalyzes the release of exported proteins from the outer surface of the *Escherichia coli* plasma membrane. *J Biol Chem*, 260: 15925-15931.

Dalbey RE, Lively MO, Bron S y van Dijnl JM (1997). The chemistry and enzymology of the type I signal peptidases. *Protein Sci*, 6: 1129-1138.

Diamond G, Russell JP, Bevins CL (1996). Inducible expression of an antibiotic peptide gene in lipopolysaccharide challenged tracheal epithelial cells. *Proc Natl Acad. Sci.*; 93:5156-60.

Referencias

- Edman M, Jarhede T, Sjoström M y Wieslander A (1999). Different sequence patterns in signal peptides from *mycoplasmas*, other gram-positive bacteria, and *Escherichia coli*: a multivariate data analysis. *Proteins*, 35: 195-205.
- Erna Cona T. (2002). Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. *Rev Chil Infect* 19 (Supl. 2): S 77-81.
- Evans EW, Harmon, BG (1995). A review of antimicrobial peptides: defensins and related cationic peptides. *Veterinary Clin. Pathol.* 24: 109-116.
- Fengliang Jin, Xiaoxia Xu, Liexi Wang, Wenqing Zhang, Dexiang Gu (2006). Expression of recombinant hybrid peptide cecropinA (1–8)– magainin2(1–12) in *Pichia pastoris*: Purification and characterization. *Protein Expr Purif*, 50:147-156
- Ganz T (2003). the role of antimicrobial peptides in innate immunity. *Integr Comp Biol*, 43:300-4.
- García-Olmedo F, Molina A, Alamillo JM, Rodríguez-Palenzuela P (1998). Plant defense peptides. *Biopolymers* 47:479–91.
- Gilbert M, Morosoli R, Shareck F y Kluepfel D. Production and secretion of proteins by *streptomyces* (1995). *Crit Rev Biotechnol*, 15: 13-39.
- Gryllos I, Tran-Winkler HJ, Cheng MF, Chung H, Bolcome R 3rd, Lu W, Lehrer RI, Wessels MR (2008). Induction of group A *Streptococcus virulence* by a human antimicrobial peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 16755-16760.
- Hancock, R.E.W. & Lehrer, R (1998). Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.* 16, 82–88
- Hara S, Yamakawa M (1996) Production in *Escherichia* of moricin, a novel type antibacterial peptide from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem Biophys Res Commun* 220(3):664–669
- Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RAB (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity, *Science* 284: 1313-1318.
- Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, Kieser T, Bruton CJ, Kieser HM, Lydiate DJ, Smith CP, Ward JM, Schrempf H. (1985). Genetic manipulation of *Streptomyces*: A laboratory manual. Norwich, CT: John Innes Foundation

Referencias

Hwang HJ (1990). Structure-function relationships of antimicrobial peptides. *Biochem. Cell Biol.* 76: 235-246.

Hwang HW (2000). Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry* 39: 1-6.

Kaneko Y, Furukawa S, Tanaka H, Yamakawa M (2007). Expression of antimicrobial peptide genes encoding enbocin and gloverin isoforms in the silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci Biotechnol Biochem*; 71:2233-41.

Kieser T, Bibb MI, Buttner MJ, Chater KF y Hopwood DA (2000). *Practical Streptomyces Genetics*. John Innes Foundation, Norwich, UK.

Koshland D, Sauer RT y Botstein D (1982). Diverse effects of mutations in the signal sequence on the secretion of beta-lactamase in *Salmonella typhimurium*. *Cell*, 30: 903-914.

Kragol GS, Lovas G, Varadi BA, Condie R, Hoffmann L, Otvos (2001). The antibacterial peptide pyrrolicorin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry* 40: 3016-3026.

Lammertyn E, Desmyter S, Schacht S, Van Mellaert L y Anne J (1998). Influence of charge variation in the *Streptomyces venezuelae* alpha-amylase signal peptide on heterologous protein production by *Streptomyces lividans*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 49: 424-430.

Lammertyn E, Van Mellaert L, Schacht S, Dillen C, Sablon E, Van Broekhoven A (1997). Evaluation of a novel subtilisin inhibitor gene and mutant derivatives for the expression and secretion of mouse tumor necrosis factor alpha by *Streptomyces lividans*. *Appl Environ Microbiol*, 63: 1808-1813.

Lee JH, Hong SS, Kim SC (1998a) Expression of an antimicrobial peptide magainin by a promoter inversion system. *J Microbiol Biotechnol* 8(1):34-41

Lee JH, Minn I, Park CB, Kim SC (1998b) Acidic peptide-mediated expression of the antimicrobial peptide buforin II as tandem repeats in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 12:53-60

Liu L, Roberts A, Ganz T (2003). By IL-signaling, monocyte-derived cells dramatically enhance the epidermal antimicrobial response to lipopolysaccharide. *J Immunol* 170: 575-580.

Referencias

- Marcos JF, Muñoz A, Pérez-Payá E, Misra S, López -García Belén (2008). Identification and Rational Design of Novel Antimicrobial Peptides for Plant Protection. *Annu. Rev. Phytopathol* 46:273–301
- Matsuzaki K (1998). Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochim Biophys Acta* 1376: 391-400.
- Matsuzaki K, Sugislita K, Fshibe N (1998). Relationship of membrane curvature to the formation of pores by magainin 2. *Biochemistry* 37:11856–11863.
- Miller H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory CHS. New York. pp 1-5.
- Miteva M, Andersson M, Karshikoff A, Otting G (1999). Molecular electroporation: a unifying concept for the description of membrane pore formation by antibacterial peptides, exemplified with NK-lysin. *FEBS Lett* 462: 155-158.
- Nakashima, N., Mitani, Y., Tamura, T., 2005. Actinomycetes as host cells for production of recombinant proteins. *Microb. Cell Fact.* 4, 7, doi:10.1186/1475-2859-4-7.
- Nikawa H, Fukushima H, Makihira S, Hamada T, Samaranayake LP (2004). Fungicidal effect of three new synthetic cationic peptides against *Candida albicans*. *Oral Dis* 10: 221–228.
- Nissen-Meyer J, Nes IF (1997). Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: Their function, structure, biogenesis and mechanism of action. *Arch. Microbiol.* 167: 67-77.
- Novagen Protein Expression (2003). *Prokaryotic Expression: pETBlue and pET System Overview*. Novagen 2002-2003 Catalog. pp 84-91.
- Otvos L Jr, Rogers ME, Consolvo PJ, Condie BA, Lovas S, Bulet P, Blaszczyk-Thurin M (2000). Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry* 39: 14150-14159.
- Ouellette AJ, Selsted ME (1996). Paneth cell defensins: Endogenous peptide components of intestinal host defense. *FASEB J*; 10:1280-9.

Referencias

- Parachin, N. S., Mulder, K. C., Viana, A. A. B., Dias, S. C., & Franco, O. L. (2012). Expression systems for heterologous production of antimicrobial peptides. *Peptides*, 38(2), 446-456.
- Park CB, Yi KS, Matsuzaki K, Kim MS, Kim SC (2000). Structure–activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 8245-8250.
- Parro V y Mellado RP (1998). A new signal peptidase gene from *Streptomyces lividans* TK21. *DNA Seq*, 9: 71-77.
- Parro V, Schacht S, Anne J y Mellado RP (1999). Four genes encoding different type I signal peptidases are organized in a cluster in *Streptomyces lividans* TK21. *Microbiology*, 145 (Pt 9): 2255-2263.
- Peschel, A. & Sahl, H.G. (2006). The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 529–536.
- Piers KL, Brown MH, Hancock RE (1993) Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria. *Gene* 134(1):7–13.
- Pimienta E., Fando R., Sánchez J.C. and Vallín C (2002). Secretion of human interferon alpha 2b by *Streptomyces lividans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58, 189.
- Pokorny A, Almeida PF (2004). Kinetics of dye efflux and lipid flipflop induced by delta-lysin in phosphatidylcholine vesicles and the mechanism of graded release by amphipathic, alpha-helical peptides. *Biochemistry* 43: 8846-8857.
- Pozidis C, Lammertyn E, Politou AS, Anne J, Tsiftoglou AS, Sianidis G (2001). Protein secretion biotechnology using *Streptomyces lividans*: large-scale production of functional trimeric tumor necrosis factor alpha. *Biotechnol Bioeng*, 72: 611-619.
- Pugsley AP, Francetic O, Driessen AJ y de L, V (2004). Getting out: protein traffic in prokaryotes. *Mol Microbiol*, 52: 3-11.

Referencias

- Pulido D. and Jiménez A (1987). Optimization of gene expression in *Streptomyces lividans* by a transcription terminator. Nucl. Acids Res., 15, 4227.
- Rao AG (1995). Antimicrobial Peptides. Molecular Plant-Microbe Interactions 8: 6-13.
- Reddy KVR, Yedery RD, Aranha C (2004) . Antimicrobial peptides: Premises and promise. International Journal of Antimicrobial Agents, 24: 536-547.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schacht S, Van Mellaert L, Lammertyn E, Tjalsma H, van Dijl JM, Bron S (1998). The Sip (Sli) gene of *Streptomyces lividans* TK24 specifies an unusual signal peptidase with a putative C-terminal transmembrane anchor. DNA Seq, 9: 79-88.
- Schägger, H., (2006). Protocol: Tricine-SDS-PAGE, Nat. Protoc.: 1(1), 16 – 22.
- Schutte BC, Mitros JP, Bartlett JA, Walters JD, Jia HP, Welsh MJ, Casavant TL, McCray PB Jr (2002). Discovery of five conserved beta-defensin gene clusters using a computational search strategy. Proc Natl Acad Sci USA 99: 2129-2133.
- Shai Y (1998). Mode of action of antibacterial peptides. In Hultmark PTBaD (ed), Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects. Chapman & Hall. London. pp 111-131.
- Sharma A, Khoury-Christianson AM, White SP, Dhanjal NK, Huang W, Paulhiac C, Friedman EJ, Manjula BN, Kumar R (1994) High-efficiency synthesis of human alpha-endorphin and magainin in the erythrocytes of transgenic mice: a production system for therapeutic peptides. Proc Natl Acad Sci USA 91(20):9337–9341
- Soliveri,J., Scheu, A.K., Hernández Copa-Patiño, J.L., Chater, K.F.,(1999). Faster Recombinant DNA-procedures for *Streptomyces*. BioTechniques 26:394-396.
- Strohl WR (1992). Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. Nucleic Acids Res, 20: 961-974.

Referencias

- Strøm, M. B., Stensen, W., Svendsen, J. S., & Rekdal, Ø. (2001). Increased antibacterial activity of 15-residue murine lactoferricin derivatives. *The Journal of Peptide Research*, 57(2), 127-139.
- Thompson CJ, Fink D y Nguyen LD (2002). Principles of microbial alchemy: insights from the *Streptomyces coelicolor* genome sequence. *Genome Biol*, 3: REVIEWS1020:1-4.
- Ueda Y., Taguchi S., Nishiyama K.I., Kumagai I. and Miura K.I (1993). Effect of a rare leucine codon, TTA, on expression of a foreign gene in *Streptomyces lividans*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1172, 26.
- Ulvatne H, Haukland HH, Olsvik O, Vorland LH (2001) Lactoferricin B causes depolarization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* ATCC 25922 and fusion of negatively charged liposomes. *FEBS Lett* 492(1-2):62-65.
- Ulvatne H, Samuelsen O, Haukland HH, Kramer M, Vorland LH (2004) Lactoferricin B inhibits bacterial macromolecular synthesis in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* 237(2):377-384
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44:135-162.
- Van Mellaert L, Lammertyn E, Schacht S, Proost P, Van Damme J, Wroblowski B (1998). Molecular characterization of a novel subtilisin inhibitor protein produced by *Streptomyces venezuelae* CBS762.70. *DNA Seq*, 9: 19-30.
- Von Heijne G y Abrahmsen L (1989). Species-specific variation in signal peptide design. Implications for protein secretion in foreign hosts. *FEBS Lett*, 244: 439-446.
- Vorland LH, Ulvatne H, Andersen J, Haukland H, Rekdal O, Svendsen JS, Gutteberg TJ (1998). Lactoferricin of bovine origin is more active than lactoferricins of human, murine and caprine origin. *Scand J Infect Dis* 30: 513-517.
- Wakabayashi H, Matsumoto H, Hashimoto K, Teraguchi S, Takase M, Hayasawa H (1999). N-Acylated and D enantiomer derivatives of a nonamer core peptide of Lactoferricin B showing improved antimicrobial activity. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 1267-1269.

Referencias

- Wright F y Bibb MJ (1992). Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces genome*. *Gene*, 113: 55-65.
- Xu Z, Wang F, Peng L, Fang X, Cen P (2005) Expression of human beta-defensin-2 with multiple joined genes in *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotechnol* 120(1):1-13.
- Yamaguchi S, Huster D, Waring A, Lehrer RI, Kearney W, Tack BF, Hong M (2001). Orientation and dynamics of an antimicrobial peptide in the lipid bilayer by solid-state NMR spectroscopy. *Biophys J* 81: 2203-2214.
- Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, Anderson M, Schröder JM, Wang JM, Howard OMZ, Oppenheim JJ (1999). B-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 286: 525-527.
- Yeaman, M.R. & Yount, N.Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* 55: 27-55.
- Yu Q, Lehrer RI, Tam JP (2000). Engineered salt-insensitive α -defensins with end-to-end circularized structures. *J. Biol. Chem.* 275: 3943-3949.
- Zasloff M (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415:389-395.
- Zhang, L., Falla, T., Wu, M., Fidai, S., Burian, J., Kay, W., & Hancock, R. E. W. (1998). Determinants of recombinant production of antimicrobial cationic peptides and creation of peptide variants in bacteria. *Biochemical and biophysical research communications*, 247(3), 674-680.



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00187
Matrícula: 2121800308

SOBREEXPRESIÓN HETEROLOGA DE
UN PÉPTIDO ANTIMICROBIANO EN
Streptomyces Lividans

En la Ciudad de México, se presentaron a las 13:30 horas del día 28 del mes de julio del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JAVIER BARRIOS GONZALEZ
DR. ANGEL EDUARDO ABSALON CONSTANTINO
DRA. ANA GISELA REYES ALVARADO
DRA. MARIA DE LOURDES VILLA TANACA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA

DE: MARISOL ROLDAN TAPIA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

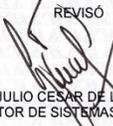
Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



MARISOL ROLDAN TAPIA
ALUMNA

REVISÓ



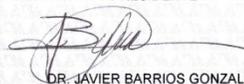
LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS



DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE



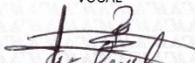
DR. JAVIER BARRIOS GONZALEZ

VOCAL



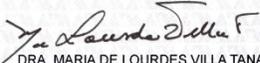
DR. ANGEL EDUARDO ABSALON
CONSTANTINO

VOCAL



DRA. ANA GISELA REYES ALVARADO

SECRETARIA



DRA. MARIA DE LOURDES VILLA TANACA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA

METROPOLITANA-UNIDAD IZTAPALAPA

POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**SOBRE-EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE UN PÉPTIDO
ANTIMICROBIANO EN *STREPTOMYCES LIVIDANS* TK24.**

VoBo

Comité Tutorial:

Dr. Armando Mejía Álvarez
(DIRECTOR)

Dra. Ana Gisela Reyes Alvarado
(ASESORA)

Dr. Javier Barrios González
(ASESOR)

Miembros del Jurado:

Dr. (Presidente): Javier Barrios González

Dra. (Secretario): Ma. de Lourdes Villa Tanaca.

Dr. (Vocal): Ángel Eduardo Absalón Constantino

Dra. (Vocal): Ana Gisela Reyes Alvarado.