



PONTIFICIA UNIVERSIDAD  
**CATOLICA**  
DE VALPARAISO



UNIVERSIDAD TECNICA  
FEDERICO SANTA MARIA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE VALPARAÍSO  
UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA

PROGRAMA CONJUNTO DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA

DISEÑO, CONSTRUCCIÓN Y EXPRESIÓN *IN VITRO* DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS  
RECOMBINANTES A PARTIR DE CECROPINA PARA SU APLICACIÓN EN EL CONTROL DE  
AGENTES PATÓGENOS EN LA ACUICULTURA

Tesis presentada para la obtención del Grado Académico  
DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

USM. BIBLIOTECA CENTRAL



3560900139366

Mauricio Díaz Ruiz

Sergio Marshall  
Gloria Arenas

MAYO, 2008

**U.T.F.S.M.**  
**BIBLIOTECAS**

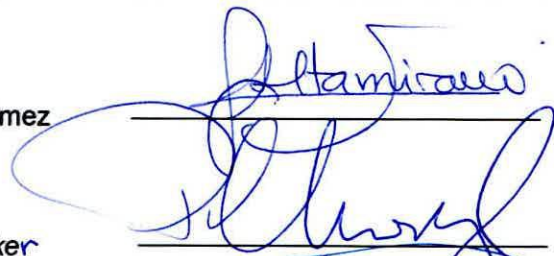
M  
572.65  
D542  
C2

**COMISION EVALUADORA**


**Presidente:** Dr. Andrés Illanes Frontaura



**Evaluador Interno:** Dra. Claudia Altamirano Gómez



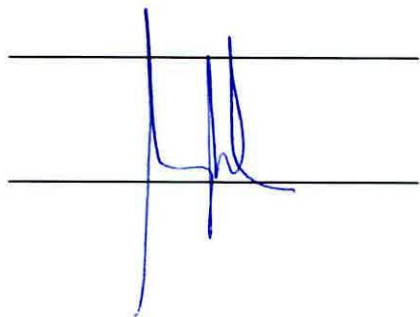
**Evaluador Externo:** Dra. Pamela Chavez Crooker



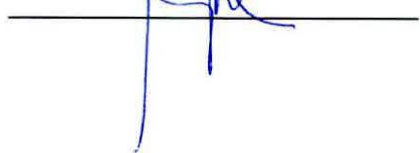
**Evaluador Externo:** Dra. Kathleen Whitlock Leaning



**Tutor:** Dra. Gloria Arenas Díaz



**Tutor:** Dr. Sergio Marshall González



## 1. RESUMEN

En la acuicultura los organismos son cultivados en lugares confinados que alcanzan altas densidades, condición que los hace susceptibles a enfermedades causadas por agentes patógenos donde destacan virus, bacterias y hongos. En este trabajo se buscó aportar una alternativa al uso de antibióticos y vacunas en el combate contra patógenos endémicos de la acuicultura, mediante el diseño y creación de moléculas recombinantes a partir de componentes naturales del sistema inmune innato de invertebrados. Para esto se utilizó el enfoque del ADN recombinante y sistemas de expresión en *Escherichia coli*.

Se diseñaron y construyeron nuevas moléculas doblete del péptido antimicrobiano cecropina A de *Drosophila melanogaster* combinando la secuencia codificante del gen CEC A1 regular (CEC<sub>dir</sub>) con su forma invertida (CEC<sub>ret</sub>) con la configuración única de CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> y CEC<sub>ret</sub>-CEC<sub>dir</sub>. Estas dos moléculas recombinantes fueron generadas usando una reacción de PCR dirigido por tres primers donde una molécula híbrida con la secuencia codificante de CEC<sub>dir</sub> fue unida en fase con la secuencia codificante de CEC<sub>ret</sub> y viceversa. Para obtener estas construcciones se sintetizó químicamente la secuencia codificante para generar un retopéptido de CEC con los mismos aminoácidos de CEC, pero con la polaridad invertida. Ambos péptidos antimicrobianos dobles fueron clonados en vectores de expresión para su posterior recuperación desde *E.coli*, buscando de esta manera evaluar su eventual actividad antimicrobiana mejorada. Se propuso un mecanismo para rastrear los péptidos antimicrobianos generados con mayor actividad generados mediante una cepa "porosa" E609L utilizando el péptido señal periplasmático *pelB*, que liberara el contenido periplasmático al medio que permitiera su monitoreo. Por otro lado se logró expresar el péptido recombinante en células *E.coli* BL21 (DE3) sin necesidad de recurrir a un péptido señal o proteína de fusión, integrado en el vector de expresión pET27b+. El péptido fue purificado obteniéndose un rendimiento importante desde cuerpos de inclusión, recuperándose además una actividad aumentada contra una variedad de patógenos comparada con la molécula parental monomérica y su retroforma. Este péptido además resultó tener baja citotoxicidad, como comprobado sobre la línea celular de peces CHSE-214, elemento crucial para su potencial aplicación terapéutica. Se intentó por otro lado por primera vez la expresión mediante el fago lambda CE6 para la expresión de péptidos antimicrobianos, debido al éxito mostrado en expresar otras proteínas extremadamente tóxicas. Adicionalmente ambos péptidos dobles, así como los péptidos parentales fueron clonados y expresados en el vector de expresión pTYB11 en células de *E.coli* ER2566, recuperando la actividad antimicrobiana en péptidos solubles mediante el autoclivaje desde una proteína de fusión asociado al splicing de proteínas (inteinas). La actividad obtenida fue equivalente para ambos modelos.

## **2. AGRADECIMIENTOS**

*Agradezco en forma especial a cada uno de las personas que ayudaron en el desarrollo de mi trabajo, tanto en la parte académica como en lo personal y permitirme hacer investigación en ciencias que es lo que realmente me apasiona.*

*A mis tutores Dra. Gloria Arenas y Dr. Sergio Marshall, agradezco por aceptarme en el Laboratorio de Genética e Inmunología Molecular, así como su dedicación, confianza e incentivo para el desarrollo de este trabajo.*

*A Luis Mercado, Paulina Schmitt, Vitalia Henríquez, Jorge Olivares, Verónica Rojas, Fernando Gómez, Patricio Cataldo, Fanny Guzmán, Claudia Palacios, Carolina Escobar, Javier Gimpel, Sandra Zelada, Rodrigo Llanca, Hugo Monzón, Luis Muñoz, Elena Venturini y Stefano Marchetti agradezco su voluntad, disposición y valiosa ayuda que contribuyeron a este trabajo.*

*A mis padres, hermano, esposa e hijo gracias por el apoyo y preocupación de siempre.*

## 3.1 INDICE GENERAL

1. Resumen.....	1
2. Agradecimientos.....	2
3. Índice	
3.1 Índice General.....	3
3.2 Índice de Tablas.....	5
3.3 Índice de Figuras.....	6
4. Introducción.....	7
5. Revisión bibliográfica.....	9
6. Hipótesis.....	17
7. Objetivos	
7.1 Objetivos Generales.....	18
7.2 Objetivos Específicos.....	18
8. Materiales y métodos	
8.1 Construcción de dobles de cecropina	
8.1.1 Diseño de secuencia codificadora de un retro péptido de cecropina A.....	19
8.1.2 Obtención de fragmentos codificantes de cecropina y su retro péptido por PCR.....	19
8.1.3 PCR de tres primers y construcción de dobles.....	19
8.1.4 Clonamiento de fragmentos codificantes de monómeros y dobles de cecropina en pET y su transformación en E.coli.....	21
8.2 Rastreo por colonia de actividad antimicrobiana de los péptidos	
8.2.1 Subclonamiento de fragmentos codificantes de monómeros y dobles de cecropina con secuencia de péptido señal pelB.....	21
8.2.2 Lisogenización de E609L.....	22
8.2.3 Verificación del lisógeno DE3.....	22
8.2.4 Expresión de péptidos en E609L "LYS".....	22
8.2.5 Purificación de péptidos en el medio de cultivo y fracción periplasmática.....	23
8.2.6 Rastreo por colonia.....	23
8.3 Expresión y purificación de péptidos dobles en sistema heterólogo E. coli BL21(DE3)	
8.3.1 Expresión de péptidos en BL21(DE3).....	24
8.3.2 Análisis de niveles de expresión por RT-PCR.....	24
8.3.3 Purificación y recuperación de péptidos de extracto celular.....	25
8.3.4 Purificación de péptidos por HPLC.....	25
8.3.5 Caracterización de péptidos por MALDI-TOF y ESI MS/MS.....	26
8.3.6 Ensayo antibacteriano.....	26
8.3.7 Ensayo antifúngico.....	26
8.3.8 Cepas microbianas y condiciones de crecimiento utilizadas en ensayos antimicrobianos.....	27
8.4 Expresión de péptidos dobles mediante inducción con fago CE6	
8.4.1 Expresión de péptidos mediante inducción con fago CE6.....	27
8.4.2 Preparación de fagos CE6.....	28
8.4.3 Titulación de fagos CE6.....	28
8.5 Evaluación de citotoxicidad de los péptidos.....	29
8.6 Expresión y purificación de péptidos dobles en sistema de fusión con inteína	
8.6.1 Subclonamiento de fragmentos codificantes de monómeros y	

<i>dobletes de cecropina en sistema inteina y su transformación en E.coli</i> .....	29
8.6.2 <i>Expresión de péptidos en ER2566</i> .....	31
8.6.3 <i>Western blot de péptidos de fusión</i> .....	31
8.6.4 <i>Purificación de péptidos por cromatografía de afinidad</i> .....	32
8.6.5 <i>Purificación de péptidos por HPLC</i> .....	32
<b>9. Resultados</b> .....	33
<b>10. Discusión</b> .....	57
<b>11. Conclusiones</b> .....	62
<b>12. Recomendaciones</b> .....	63
<b>13. Nomenclatura</b> .....	64
<b>14. Referencias</b> .....	65
<b>15. Anexo</b>	
15.1 <i>Medios de cultivo</i> .....	83
15.2 <i>Publicaciones generadas a partir del trabajo</i> .....	84

### 3.2 INDICE DE TABLAS

Tabla 9.1	Perfil antimicrobiano <i>in vitro</i> de fracción post-HPLC de CEC <sub>dir</sub> -CEC <sub>ret</sub> aislado de BL21.....	47
Tabla 9.2	Ensayo <i>in vitro</i> de citotoxicidad de doblete CEC <sub>dir</sub> -CEC <sub>ret</sub> aislado de BL21.....	48
Tabla 9.3	Perfil antimicrobiano de fracción post-HPLC de CEC <sub>dir</sub> -CEC <sub>ret</sub> aislado de ER2566 mediante sistema inteina.....	56

### **3.3 INDICE DE FIGURAS**

Figura 9.1	Diseño de síntesis de secuencia codificante de péptido invertido de cecropina.....	33
Figura 9.2	PCR de cecropina y retrocecropina.....	33
Figura 9.3	Diseño y secuencia de de dobletes de cecropina.....	34
Figura 9.4	Perfil PCR de dobletes de cecropina.....	35
Figura 9.5	Transformación de monómeros y dobletes de cecropina en TOP10.....	36
Figura 9.6	Diseño de clonamiento con y sin secuencia señal periplasmática en pET27.....	36
Figura 9.7	Selección de lysógenos de E609L.....	37
Figura 9.8	Transformación de monómeros y dobletes de cecropina en E609L "LYS".....	37
Figura 9.9	Perfil de expresión de cecropina en E609L"LYS".....	38
Figura 9.10	Transformación de monómeros y dobletes de cecropina en BL21(DE3).....	39
Figura 9.11	Perfil de expresión de monómeros y dobletes de cecropina con péptido señal pelB.....	40
Figura 9.12	Purificación de cecropina y doblete con pelB por Sep-Pak.....	40
Figura 9.13	Perfil de expresión de doblete de cecropina sin pelB.....	41
Figura 9.14	Perfil de expresión mediante RT-PCR de cultivos de doblete de cecropina.....	41
Figura 9.15	Purificación de doblete por Sep-Pak.....	42
Figura 9.16	Purificación de doblete por RP-HPLC.....	43
Figura 9.17	Espectro MALDI-TOF MS de doblete.....	44
Figura 9.18	Análisis MALDI-TOF MS de digestión triptica total de doblete.....	45
Figura 9.19	Fragmentación por Espectrometría de masa provisto con trampa iónica del peak 2040.1 de la degradación triptica.....	46
Figura 9.20	Transformación de monómeros y dobletes de cecropina en BL21 (sin DE3).....	48
Figura 9.21	Titulación de infección de células LE392 con fago lambda CE6.....	49
Figura 9.22	Perfil de expresión de monómeros y dobletes de cecropina (BL21 sin DE3).....	49
Figura 9.23	Diseño de clonamiento en pTYB11.....	50
Figura 9.24	Transformación de monómeros y dobletes de cecropina en TOP10 y ER2566.....	50
Figura 9.25	Perfil de expresión de cecropina (ER2566).....	51
Figura 9.26	Perfil de expresión de cecropina (ER2566).....	51
Figura 9.27	Perfil de expresión de cecropina y retrocecropina (ER2566).....	52
Figura 9.28	Perfil de expresión de dobletes de cecropina (ER2566).....	52
Figura 9.29	Purificación y recuperación de péptidos de extracto celular.....	53
Figura 9.30	Western blot de proteína de fusión.....	53
Figura 9.31	Purificación de monómero y doblete de cecropina por columna de quitina.....	54
Figura 9.32	Purificación de monómero y doblete de cecropina por RP-HPLC.....	55

## **4. INTRODUCCION**

Durante los últimos años, se han registrado importantes incrementos en la cantidad de peces para consumo humano procedente de la acuicultura, la cual se estima que en 2006 suministró cerca del 50 por ciento del total disponible para dicho consumo, según datos de la FAO. La producción de la acuicultura ha hecho aumentar la demanda y el consumo de varias especies de valor elevado, como camarones, salmones y bivalvos. Desde mediados del decenio de 1980, la producción de estas especies ha dejado de proceder principalmente de la captura silvestre para proceder principalmente de la acuicultura. Esto junto con el impacto de la sobrecaptura de los productos marinos, el crecimiento demográfico y los cambios de clima global, han dejado casi el 50% de los stock marinos completamente explotados alcanzando los límites de sustentabilidad, hacen de la acuicultura el único sector que puede cumplir con la demanda. Para Chile la acuicultura y más específicamente la salmonicultura, se ha tornado en un nicho económico, convirtiéndose en un productor y exportador de trucha y salmón a nivel mundial. Chile ocupa el segundo lugar de la producción de salmón cultivado en el mundo, sólo aventajado por Noruega, representando en conjunto el 70%. Según datos del IFOP en su reporte del 2006, los retornos de las exportaciones en la acuicultura chilena alcanzaron los US\$ 3.682 millones, de los cuales US\$ 2.210 millones correspondieron a salmónidos representando el 60% de la facturación de toda la industria, y alrededor del 5% de las exportaciones totales del país. A esto hay que sumarle el crecimiento paulatino de otras especies que se incorporen a la actividad acuícola nacional, abriendo un abanico de posibilidades para este sector económico. Entre estas especies se encuentran Ostiones, Choritos, Ostras, Abalón y Turbot. Esto hace de la acuicultura un área de gran relevancia en la producción de alimentos en el presente y de gran proyección económica.

A pesar de la oportunidad económica de la acuicultura, hay varios factores que pueden impactar la producción acuícola, siendo las enfermedades infecciosas el de mayor riesgo (Meyer, 1991; Bondad-Reantaso et al., 2005; Subasinghe, 2005). En la acuicultura chilena los organismos son cultivados en lugares confinados y en altas densidades (cultivos intensivos), condición que las hace susceptibles a enfermedades causadas por patógenos oportunistas, lo que provoca un problema de supervivencia de los cultivos confinados viéndose seriamente afectados tanto en su viabilidad como en su sustento comercial (Raison y Jorgensen, 2002; Gornati et al., 2004).

Entre los patógenos a vigilar por el informe sanitario de Sernapesca del 2006, se encuentran la bacteria Gram-positiva *Renibacterium salmoninarum* causante de la “Enfermedad Bacteriana del Riñón” (BKD), las bacterias Gram-negativas *Yersinia ruckeri* causante de la “Enfermedad Entérica de la Boca Roja” (ERM), *Piscirickettsia salmonis* causante de la “Septicemia Rickettsial del Salmón” (SRS) Los virus IPN causante de la “Necrosis Pancreática Infecciosa” (IPN), el virus ISA causante de la “Anemia infecciosa del salmón” (ISA), además de la saprolegniosis causada por el hongo *Saprolegnia sp.* que generan grandes pérdidas económicas en la salmonicultura chilena (Salmonicultura, 2000). “Vibriosis” causada por la bacteria Gram-negativa *Vibrio sp.*, es otra enfermedad que genera grandes pérdidas especialmente al cultivo de moluscos (Robert et al., 1996) y crustáceos (Aguirre y Ascencio, 2000).

El uso de antibióticos y vacunación ha aliviado parcialmente este problema, sin embargo, el uso indiscriminado de antibióticos ha generado resistencia en los patógenos, residuos de antibióticos en los peces y daños al medio ambiente (Dixon, 1994; Evelyn, 1996; Cabello, 2004). Por otro lado las vacunas involucran una manipulación estresante para el animal (Horne, 1997; Carvajal, 2000), que además puede disminuir la respuesta inmunitaria y facilitar la infección por agentes patógenos (Kinkelin et al., 1991). Otro elemento a considerar es que no son ni aplicables en invertebrados marinos ni en estadios tempranos de peces que no presentan un sistema inmune completamente desarrollado (Tatner y Manning, 1985). Además requieren tiempos más prolongados de respuesta inmunológica, especialmente bajo condiciones subóptimas (como bajas temperaturas) y generalmente sirven sólo para un patógeno determinado (Jia et al., 2000; Noga, 2001). Así mismo la protección suministrada por las vacunas no es siempre completa, como lo demuestran los numerosos brotes de SRS en salmón del atlántico del 2002, observándose una eficacia parcial de las vacunas para combatir la enfermedad (Aquanoticias, 2003). Esto ha llevado a la búsqueda de alternativas a los antibióticos y vacunas.

## **5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

La inmunidad innata desempeña un papel especialmente importante en la defensa de organismos marinos cultivables (Sakai, 1999; Whyte, 2007). Esto dado que los peces no presentan un sistema inmune específico completamente desarrollado, sobretodo en estadios tempranos juveniles, así como los invertebrados marinos, como crustáceos y moluscos, donde la inmunidad innata es el único mecanismo inmunológico por el cual se protegen contra las enfermedades, al carecer de la inmunidad específica (Josefsson y Tatner, 1993; Söderhall y Cerenius, 1992). En este sentido el sistema inmune innato presenta una serie de ventajas en comparación con el sistema inmune específico. La naturaleza inespecífica del sistema inmune innato le confiere un amplio rango de actividad antimicrobiana, que permite una protección contra múltiples patógenos a la vez, a diferencia de la inmunidad específica que sólo reconoce un antígeno/patógeno específico. Estas defensas muchas veces se encuentran activas en forma constitutiva, lo que brinda una protección constante ante patógenos. Estas defensas son generalmente abundantes en los portales de entrada (piel, agallas y tubo digestivo), pudiendo así evitar la invasión del patógeno antes de que ocurra daño. Este sistema es rápidamente inducible (dentro de horas o pocos días), lo que permite responder rápidamente ante un patógeno, a diferencia de las respuestas inmunes específicas que requieren mucho más tiempo para responder (Noga, 2001).

En este respecto el descubrimiento de una nueva generación de moléculas con actividad antimicrobiana, llamadas péptidos antimicrobianos (AMPs), propios del sistema inmune innato que presentan una rápida acción y una poderosa actividad antimicrobiana contra un amplio rango de patógenos (Scott y Hancock, 2000; Tossi et al., 2000), ha permitido centrar la atención en ellos como una alternativa natural de profilaxis. Purificar AMPs, a partir de los organismos que los sintetizan, para su aplicación a cultivos confinados como una alternativa a los antibióticos clásicos, podría ser la base para desarrollar tecnologías nuevas y más eficientes para el control de enfermedades que afectan los cultivos disminuyendo significativamente la producción.

Los AMPs son típicamente catiónicos y anfipáticos, de doce a cien residuos aminoacídicos, presentan una gran diversidad (Cudic y Otvos, 2002; Zasloff, 2002; Tossi y Sandri, 2002), y es posible encontrar una gran variedad de ellos en un mismo huésped

(Hancock, 2001). Todos los AMPs son sintetizados como prepropéptidos, siendo el péptido maduro el que posee actividad (Zasloff, 2002). Ellos tienen dos tipos de roles en la inmunidad innata: Primero, son capaces de matar microbios, actividad que es aumentada por sinergia entre péptidos individuales dentro del huésped (Lüders et al., 2003), o por sinergia entre estos péptidos con otros factores del huésped, como la lisozima (Hancock y Scott, 2000). Segundo, ciertos péptidos han mostrado tener actividad inmunoestimuladora o quimiotáctica al facilitar la función de células fagocíticas (Fu et al., 2004; Scott et al., 2002; Yang et al., 2000). Estos “antibióticos naturales” son almacenados en gránulos de células fagocíticas de los eucariotas (neutrófilos y macrófagos), para ser liberados al fagosoma o al medio extracelular, para matar o contener el crecimiento de patógenos invasores. Células epiteliales pueden producir y liberar constitutivamente estas sustancias, especialmente en las superficies mucosas, controlar la microflora local y prevenir infección de lesiones (Tossi y Sandri, 2002). Estos péptidos antimicrobianos se han aislado de virtualmente todas las especies vivas, incluyendo la gran mayoría de los organismos marinos cultivables (Khoo et al., 1999; Mitta et al., 2000; Cole et al., 1997).

Los péptidos antimicrobianos tienen como blanco la membrana celular microbiana que los distingue de las células animales por estar organizadas de tal forma que la cara expuesta de su bicapa lipídica, está poblada de lípidos cargados negativamente. En contraste, la cara expuesta de las membranas de las células animales están compuestas por lípidos sin carga neta, con los lípidos de carga negativa ubicados en la cara interna, hacia el citoplasma (Matsuzaki, 1999). Esto es de gran relevancia, dado que permite atacar en forma selectiva a los microorganismos, sin generar citotoxicidad en los animales. Esta característica es aprovechada por la naturaleza catiónica y anfipática del péptido, que con su región hidrofílica cargada positivamente, segregada de la región hidrofóbica del péptido, puede interactuar electrostáticamente e hidrofóticamente con la membrana microbiana. La cationicidad favorece la interacción inicial con la membrana externa hidrofílica cargada negativamente, mientras que la región hidrofóbica del péptido favorece su inserción en la componente hidrofóbica de la membrana (Hancock y Rozek, 2002; Giangaspero et al., 2001). Este mecanismo involucra la permeabilización de la membrana por el péptido, mediante interacciones no específicas, provocando el desplazamiento de lípidos, alteración de la estructura de la membrana y en algunos casos la entrada del péptido al interior de la célula blanco, que sigue el modelo de Shai-Matsuzaki-Huang

(Shai, 1999; Matsuzaki, 1999; Yang et al., 2000). La actividad antimicrobiana de estos péptidos se logra mediante la despolarización, colapso de la membrana celular (Westerhoff et al., 1989; Yang et al., 2000; Cudic et al., 2002) o el daño de blancos intracelulares, después de la entrada del péptido (Kragol et al., 2001; Yeaman e Yount, 2003).

Las bacterias Gram-negativas difieren de las bacterias Gram-positivas en que tienen una pared celular de peptidoglicano más delgada, pero poseen una membrana exterior y espacio periplásmico, con enzimas como la  $\beta$ -lactamasa, además de la membrana citoplasmática común. Esta membrana es una barrera a muchos agentes antimicrobianos, lo que hace a las bacterias Gram-negativas un blanco más difícil y generalmente más resistentes a los antibióticos (Hancock, 1997). Contrariamente, las células utilizan una vía de captación para los péptidos antimicrobianos diferente a la de los antibióticos, por la membrana externa, llamado captación autopromovida (Sawyer et al., 1988; Hancock y Chapple, 1999), que generalmente hace que ellos funcionen tan bien o mejor contra bacterias Gram-negativas que contra bacterias Gram-positivas. Esto es de gran relevancia, dado que los patógenos bacterianos son la causa principal de enfermedades en la acuicultura intensiva, siendo los principales patógenos bacterias Gram-negativas (Meyer, 1991; Thune et al., 1993).

A diferencia de los antibióticos convencionales, en los cuales la adquisición de resistencia por parte de los patógenos es bastante común (Walsh, 2000), la resistencia a los péptidos antimicrobianos es bastante improbable (Lucentini, 2003), debido a que ejercen su actividad alterando las propiedades de la membrana citoplasmática y no interfieren en el metabolismo de la bacteria como los antibióticos. La razón es que el blanco de los péptidos es la membrana bacteriana, por lo que un microorganismo tendría que rediseñar la membrana, es decir el medio ambiente de la célula, cambiando la composición y/o organización de sus lípidos, probablemente una solución demasiado "costosa" para la mayoría de las especies microbianas (Zaslhoff, 2002). Esto es de gran importancia, dado que en un futuro cercano, la resistencia a los antibióticos no dejará terapias efectivas para el tratamiento de infecciones bacterianas.

Un registro de las bases de datos de patentes de AMPs demuestra un amplio rango de aplicaciones propuestas, incluyendo tratamiento de infecciones virales, bacterianas y

fúngicas, tumores, úlceras gástricas, úlceras de piel, enfermedades de la cavidad bucal, enfermedades oftálmicas, enfermedades de transmisión sexual y sepsis, terapia génica, esterilización de instrumental de hospital y cirugía, uso como preservante de alimentos, producción de plantas transgénicas y animales (Tossi y Sandri, 2002). Sin embargo su aplicación todavía está en desarrollo y por ahora está principalmente centrada en agentes antiinfecciosos de uso tópico (Zaslhoff, 2002). Nisina es el único péptido que ha estado en el mercado, mundialmente, por varios años como preservante de alimento. Diversos análogos de péptidos antimicrobianos se encuentran en diferentes fases de ensayo clínico I, II y III o preclínico, en el tratamiento de úlceras de diabéticos, prevención de mucositis oral en pacientes de quimio y radioterapia, prevención de neumonías asociada a ventilador mecánico y en el tratamiento de infecciones relacionadas con la fibrosis cística, prevención de infecciones sanguíneas relacionadas a catéteres, tratamiento de candidiasis oral y gingivitis, tratamiento del acné y úlceras de córnea, para uso sistémico contra infecciones de meningitis, entre otros (Tossi y Sandri, 2002). Investigación de la expresión de péptidos en GMOs, especialmente en plantas, es bastante extensiva (Huang et al., 1997). También se está empezando a sugerir que la tecnología transgénica puede ser útil en la protección de animales alimento, lográndose transferir algunos beneficios contra enfermedades (Sarmasik et al., 2002).

A pesar de todas las ventajas de estos péptidos antimicrobianos, el uso masivo potencial de estos compuestos naturales está restringido por las cantidades limitantes que pueden ser extraídas de *in vivo* (Mercado et al., 2005), situación que requeriría cantidades enormes para una aplicación terapéutica (Tossi y Sandri, 2002; Marshall y Arenas, 2003). Otras alternativas exploradas incluyen la síntesis química (Andreu et al., 1983; Merrifield et al., 1995) que dado el tamaño reducido de los péptidos es un método útil para generar cantidades moderadas del péptido. Sin embargo, presenta ciertas desventajas como son su elevado costo, sobretodo para propósitos de mayor escala y en menor medida la limitación de sintetizar péptidos con abundancia de residuos de triptófano o arginina (Zhang et al., 1998). Además la síntesis en fase sólida resulta en la cosíntesis de péptidos contaminantes que pueden llevar a una dificultad en el proceso de purificación en péptidos mayores a 20 residuos de aminoácido. Esto puede resultar en una complicación en la purificación HPLC, donde los contaminantes que migran muy de cerca como las delecciones de sólo un aminoácido, a veces son imposibles de eliminar del péptido correcto (Kuliopulus, 1994). Otro elemento a considerar es la racemización durante la

formación del enlace peptídico (Guzmán et al., 2007) y la naturaleza tóxica de los solventes y agentes de acoplamiento que provoca preocupación ambiental (Gill et al., 1996; Nilsson et al., 2005). La tecnología del ADN recombinante ha jugado un papel muy importante en el desarrollo de la biotecnología de proteínas, ya que gracias a la manipulación de genes ha sido posible producir grandes cantidades de proteínas. *E.coli* es el huésped más utilizado, dado que facilita la expresión de proteínas gracias a su simplicidad, bajo costo, su rápido cultivo de alta densidad, su genética conocida y el amplio número de herramientas moleculares disponibles. Clásicamente los péptidos antimicrobianos son codificados por genes pequeños, con secuencias conservadas y patrones que hacen su clonamiento fácil, y debiera permitir una expresión y purificación a escala pequeña y grande (Uteng et al., 2002). Existen numerosos reportes de expresión heteróloga de péptidos antimicrobianos en *E.coli* con diferentes grados de éxito (Xu et al., 2007; Rao et al., 2004; Yang et al., 2003). En los sistemas de expresión heterólogos es posible producir grandes cantidades de proteínas siempre y cuando el hospedero sea insensible a los efectos del péptido expresado (Zhang et al., 1998). Para lograr la expresión en bacterias es en general necesario expresar los AMP como una proteína de fusión para negar la actividad antimicrobiana del péptido (Piers et al., 1993) para que el péptido recombinante no sea tóxico para el hospedero lo que afecta su viabilidad, capacidad de expresión y degradación de la proteína recombinante. El problema de la proteína de fusión se suscita al separarla del péptido a expresar para recuperar su actividad. Un proceso que normalmente requiere el clivaje químico como con el tóxico bromuro de cianógeno (CNBr) o el uso de costosas proteasas y que muchas veces no es del todo eficiente.

En un intento por desarrollar péptidos antimicrobianos con potencia aumentada y rango de acción (Chen et al., 2005; Juvvadi et al., 1999) o buscando la selectividad contra algún patógeno determinado (Sung et al., 2008; Landon et al., 2008), acoplado con una disminución de la actividad hemolítica o citotóxica (Liu et al., 2008) se ha recurrido al diseño de nuevos péptidos con D-aminoácidos (Merrifield et al., 1995), aminoácidos no naturales (Hicks et al., 2007), modificaciones de aminoácidos con carga (Wang et al., 1998), propiedades anfipáticas (Chen et al., 2007; Juvvadi et al., 1996) y el largo del péptido (Andreu et al., 1992). También se ha hecho uso de la bioinformática para analizar o simular la interacción entre el péptido y la membrana del microorganismo (Hao et al., 2008; Maytus et al., 2007).

La mayoría de los péptidos (AMPs) actúan penetrando las membranas bacterianas y promoviendo su lisis celular que es dependiente de su naturaleza catiónica y antipática (Yount y Yeaman, 2005). También se ha sugerido que en casos de concentraciones lo suficiente altas de péptidos adsorbidos el mecanismo depende de un proceso de dimerización u oligomerización de los péptidos mientras interactúan con la membrana bacteriana, que resulta en la formación de poros (Zemel et al., 2005). Estudios utilizando análogos de melittina y magainina dimerizada por puentes disulfuro respaldan la idea de que un dímero autoasociado adsorbido actúa en el mecanismo de formación de poros (Dempsey et al., 2003; Hristova et al., 2001). La formación espontánea de dímeros unidos por puentes disulfuro o la ingeniería de dímeros a través de crosslinking (Dempsey et al., 2003; Tencza et al., 1999) mostraron actividad de permeabilización de membrana aumentada comparada con el monómero correspondiente, especialmente a bajas concentraciones. Se ha sugerido que la perturbación de membrana resultante de la formación del dímero de péptido es el evento esencial que gatilla el cambio de orientación del péptido y formación del poro (Hristova et al., 2001). Evidencia también muestra la existencia de homo y heterodímeros como distintiva de la rana *P. distincta* (Batista et al., 2001) y la los péptidos relacionada con cryptidina en ratón (Hornet et al., 2004). Además se ha observado que la mezcla de AMPs distintos interactúan uno con el otro de manera sinérgica aumentando su actividad (Luders et al., 2003).

Dentro de los AMP más estudiados resalta la cecropina. Las cecropinas son péptidos lineales, aislados inicialmente desde insectos, que presentan una región N-terminal fuertemente básica, enriquecida en lisina, y una región hidrofóbica C-terminal (Holak et al., 1988; Boman, 1991). Su estructura basal consiste de dos alfa-hélices antipáticas separadas por una región puente que conecta las alfa-hélices (Iwai et al., 1993). La región fuertemente catiónica permite su interacción con la membrana microbiana, mientras que la larga cola hidrofóbica induce la lisis microbiana por alteración de la permeabilidad de la membrana (Durell et al., 1992; Silvestro et al., 1997). La cecropina A de *Drosophila melanogaster* es un péptido policatiónico que presenta actividad contra un amplio rango de bacterias gram positiva y especialmente sobre gram negativas (Zasloff 2002; Boman 1998). Estudios de la evolución molecular de cecropina (Ramos-Onsins y Aguadé, 1998) demuestra la importancia de esta familia multigénica en diferentes especies de invertebrados.

La razón de utilizar péptidos antimicrobianos de invertebrados es que éstos organismos presentan un sistema inmune innato altamente eficiente, debido a la ausencia del sistema inmune adquirido, por lo que presentan péptidos con una alta actividad antimicrobiana y amplio rango de acción (Hancock et al., 2006). Esto ha llevado a probar su utilidad en el combate contra agentes patógenos, en distintos sistemas, incluyendo peces (Jia et al., 2000; Sarmasik et al., 2002).

En este trabajo, se diseñó y construyó dobles de cecropina esperando obtener, en una sola molécula, la mejor eficiencia antimicrobiana de sus moléculas parentales, ya sea por disminución de la concentración mínima inhibitoria contra un tipo de agente, o bien por el aumento del espectro de agentes patógenos susceptibles. La cecropina en específico fue seleccionada por su elevada actividad antimicrobiana sobre un amplio rango de patógenos, baja citotoxicidad (Zaslouff 2002; Boman 1998) y presentar dominios estructurales claramente definidos (Iwai et al., 1993) que pueden ser utilizados para la formación de péptidos híbridos. Además es uno de los pocos péptidos que se ha logrado definir valores estándar de concentración mínima inhibitoria del crecimiento microbiano (Bulet y Bacheré, 2002). Estos constructos, fueron clonados en diversos vectores de expresión y expresados en células de *E.coli*, buscando de esta manera evaluar su eventual actividad antimicrobiana mejorada.

Dentro de las múltiples alternativas de vectores de expresión se optó por el de un vector con el promotor inducible *T7lac* y uno que permitiera la unión de una proteína de fusión que se autoescinde mediante splicing de proteínas (sistema inteina). Se usó vectores de expresión que presentan promotores inducibles, dado que la producción prematura de la proteína recombinante puede impedir el crecimiento celular (Jonasson y Col, 2002). Por ello se mantiene reprimido el promotor durante la fase de crecimiento hasta alcanzar una alta densidad celular, después de la cual la producción es iniciada por la inducción del promotor, permitiendo a la célula usar la mayoría de sus recursos para la producción de la proteína de interés (Jonasson y Col, 2002). Los genes clonados en el plásmido pET se transcriben bajo el control del promotor *T7lac*, cuando se activa el gen *DE3* de la célula hospedadora que permite la transcripción de la T7 RNA polimerasa en la célula huésped bajo control de promotor *lac* (Studier y Moffat, 1986). La expresión de los péptidos se logró al añadir el inductor IPTG (análogo de lactosa que no se metaboliza), que se une al

represor lac (transcrito desde gen regulador *lacI*), impidiendo su unión al operador y permitiendo la unión de la T7 RNA polimerasa al promotor *T7lac* del plasmido activando así la transcripción.

El splicing de proteínas es un mecanismo de procesamiento post-traducciona que involucra el corte de un segmento interno de proteína, la inteína, desde una proteína precursora y la posterior ligación de las regiones flanqueantes N y C-terminal (exteínas). El sistema IMPACT-CN utiliza un gen de la inteína de *Saccharomyces cerevisiae* VMA1 (inteína VMA1) que ha sido modificado para producir un corte controlado del enlace peptídico en ambos extremos de la inteína, inducido por DTT. En el vector de fusión N-terminal, el plásmido pTYB11, el extremo N-terminal del péptido es fusionado al extremo C-terminal de la inteína (Asn454). En este sistema modificado la inteína tiene una sustitución que cambia el penúltimo residuo (His453) por una glutamina, permitiendo el corte sin la ligación de la N-exteína (secuencia de proteína de maltosa que provee un inicio de traducción favorable) y la C-exteína (péptido).

El sistema de *E.coli* fue seleccionado por su simplicidad, bajo costo, su rápido cultivo de alta densidad, su genética conocida y el amplio número de herramientas moleculares disponibles. Además la cecropina no presenta puentes disulfuro lo que hace innecesario un sistema más complejo para su adecuada formación. Además se ha demostrado el éxito de *E.coli* en la expresión de múltiples proteínas de interés terapéutico. Dentro de la búsqueda de este trabajo estaba el encontrar un sistema apto para la expresión de estos péptidos debido a la ausencia de un sistema óptimo para la expresión de estos péptidos (Yamada et al., 1990; Aly et al., 1999; Skosyrev et al., 2003).

## **6. HIPÓTESIS**

El diseño y construcción de dobles de las secuencias codificadoras de cecropina y su forma invertida, permite generar recombinantes que expresados en sistemas heterólogos muestran mayor actividad o espectro de acción que los péptidos parentales sobre agentes patógenos que afectan la acuicultura.

## **7.1 OBJETIVOS GENERALES**

- Construir y expresar péptidos recombinantes en *E. coli* y seleccionarlos por su actividad antimicrobiana.
- Evaluar el potencial antimicrobiano de los péptidos seleccionados expresados en el sistema de fusión con inteina.

## **7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Construir péptidos dobles a partir de las secuencias codificadoras de cecropina y su forma invertida.
2. Rastrear y seleccionar péptidos dobles de mayor eficiencia expresados en *E. coli* E609L.
3. Expresar y evaluar los péptidos dobles seleccionados en sistema heterólogo *E. coli* BL21(DE3).
4. Expresar péptidos dobles mediante inducción con sistema de fago CE6.
5. Evaluar la citotoxicidad de los péptidos híbridos en la línea celular modelo CHSE-214.
6. Expresar y evaluar los péptidos híbridos en sistema de fusión con inteina.

## **8. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **8.1 Construcción de dobles de cecropina**

#### *8.1.1 Diseño de secuencia codificadora de un retro péptido de cecropina A*

Las secuencias codificadoras de los péptidos antimicrobianos parental maduro de Cecropina A1 de *Drosophila melanogaster*, de 39 aa Genbank X16972 (Protein\_ID CAA34843) y su forma invertida fueron sujetos a PCR dirigida por tres primers. Para ello fue necesario diseñar una secuencia codificadora de un retro péptido de cecropina A para ajustarse a la polaridad esperada para cada uno de los tripletes que forman parte del nuevo gen CEC<sub>ret</sub>, y fue sintetizado por GenScript, EE.UU. El retro péptido resultante esta conformado por L-aminoácidos en los cuales los residuos de aminoácidos están ensamblados en la dirección opuesta al péptido nativo (Merrifield et al., 1995).

#### *8.1.2 Obtención de fragmentos codificantes de cecropina y su retro péptido por PCR*

Un fragmento de DNA codificante de la cecropina madura fue obtenido mediante amplificación por PCR a partir de plasmidio que portaba el gen CEC A1 (gentileza de Dr. Dan Hultmark). La secuencia del primer 5' usado para el PCR fue (5'-GGGTGGCTGAAGAAAATTG-3') correspondiente a los codones Gly<sup>+1</sup> a Ile<sup>+6</sup>. El primer 3' (5'-ACCTCGGGCAGTTGCGGCG-3') es complementario a los codones Ala<sup>+35</sup> a Gly<sup>+40</sup> (sin codón de término). Un fragmento de DNA codificante de la retrocecropina A madura fue obtenido por PCR del plasmidio que portaba el gen retro CEC A1 (CEC<sub>ret</sub>) (obtenido de Genscript), usando el primer 5' primer (5'-GGTCGAGCCACTGCAGCCG-3') y primer 3' (5'-CCCCACAGCTTTTAAATG-3'). PCR fue realizado con Taq polimerasa platinum (Invitrogen) bajo las siguientes condiciones: incubación a 94°C por 10 min, 30 ciclos de incubación a 94°C por 30 seg, 55°C por 30 seg, 72°C por 45 seg, y una incubación final a 72°C por 10 min. El producto PCR de CEC<sub>dir</sub> y CEC<sub>ret</sub> fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa (2%) y purificado usando Rapid Gel extraction system (Marligen).

#### *8.1.3 PCR de tres primers y construcción de dobles*

Los fragmentos resultantes fueron usados como templado para el PCR dirigido por tres primers, donde la secuencia codificante de CEC<sub>dir</sub> fue unido en fase con la secuencia codificante de CEC<sub>ret</sub> para el doblete con la configuración [(NH<sub>2</sub>)cabeza-cola(COOH)]▼[(COOH)cola-cabeza(NH<sub>2</sub>)] nombrado como CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> y la secuencia

codificante de CEC<sub>ret</sub> fue unido en fase con la secuencia codificante de CEC<sub>dir</sub> para el doblete con la configuración [(COOH)cola-cabeza(NH<sub>2</sub>)]▼[(NH<sub>2</sub>)cabeza-cola(COOH)] nombrado como CEC<sub>ret</sub>-CEC<sub>dir</sub>.

Para la construcción de CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> el PCR fue realizado con un primer híbrido complementario a los últimos 7 codones de CEC<sub>dir</sub> y a los primeros 7 codones de CEC<sub>ret</sub> (5'-GACGGCTGCAGTGGCTCGACACCTCGGGCAGTTGCGGCGAC-3'), como también el primer 5' (5'-GAGATATACATATGGGGTGGCTGAAGAAAA-3') correspondiente a los codones Gly<sup>+1</sup> a Ile<sup>+6</sup> de CEC<sub>dir</sub>, y el sitio de restricción para NdeI, y el primer 3' (5'-GCGGATCCTCATCACCCCCACAGCTTTTTAA-3') complementario a los codones Ile<sup>+35</sup> a Gly<sup>+40</sup> de CEC<sub>ret</sub>, con un codón de término y un sitio de restricción para BamHI.

El mismo procedimiento fue usado para la construcción de CEC<sub>ret</sub>-CEC<sub>dir</sub> usando un primer híbrido complementario a los últimos 7 codones de CEC<sub>ret</sub> y los primeros 7 codones de CEC<sub>dir</sub> (5'-GCCAATTTTCTTCAGCCACCCCCCCCACAGCTTTTTAATGCC-3'), como también el primer 5' (5'-GAGATATACATATGGGTGCGAGCCACTGCAG-3') correspondiente a los codones Gly<sup>+1</sup> a Ala<sup>+6</sup> de CEC<sub>ret</sub>, y el sitio de restricción para NdeI, y el primer 3' (5'-GCGGATCCTCATCAACCTCGGGCAGTTGCGG-3') complementario a los codones Ala<sup>+35</sup> a Gly<sup>+40</sup> de CEC<sub>dir</sub>, con un codón de término y un sitio de restricción para BamHI.

El PCR fue realizado con Taq polimerasa platinum (Invitrogen) bajo las siguientes condiciones: incubación a 94°C por 10 min, 30 ciclos de incubación a 94°C por 30 seg, 65°C por 30 seg, 72°C por 45 seg, y una incubación final a 72°C por 10 min, usando diferentes concentraciones del primer híbrido.

En forma paralela el fragmento de DNA CEC<sub>dir</sub> fue amplificado con el primer 5' (5'-GAGATATACATATGGGGTGGCTGAAGAAAA-3') y el primer 3' (5'-GCGGATCCTCATCAACCTCGGGCAGTTGCGG-3'), mientras que CEC<sub>ret</sub> fue amplificado con el primer 5' (5'-GAGATATACATATGGGTGCGAGCCACTGCAG-3') y el primer 3' (5'-GCGGATCCTCATCACCCCCACAGCTTTTTAA-3') para incorporar los sitios de restricción NdeI y BamHI.

#### 8.1.4 Clonamiento de fragmentos codificantes de monómeros y dobles de cecropina en pET y su transformación en *E.coli*

Los fragmentos de los monómeros y los dobles resultantes fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa (2%), precipitados por métodos estándar (Sambrook et al., 1989) y sujetos a digestión por con enzimas de restricción con NdeI y BamHI. Los fragmentos resultantes fueron precipitados de nuevo y ligados entre los sitios de restricción NdeI y BamHI del sitio de múltiple clonamiento de pET27b+ (Novagen). Plasmidio en que la transcripción de los genes clonados esta controlado por el promotor T7lac que es inducible por isopropil  $\beta$ -D-tio-galactopiranosido (IPTG). La mezcla de ligación fue usada para transformar células competentes de TOP10 (Invitrogen). La transformación fue analizada mediante PCR de colonias resistentes a kanamicina y electotroforesis en gel de agarosa 2%. El DNA plasmidial fue aislado mediante miniprep kit (Quiagen). Plasmidios fueron secuenciados para confirmar la identidad de las construcciones. Los plasmidios de expresión fueron luego usados para transformar células competentes de E609L (Yem y Wu, 1978), BL21(DE3) (Stratagene) y células BL21 (sin DE3) (Stratagene). La transformación fue analizada mediante PCR de colonias y electotroforesis en gel de agarosa 2%.

## 8.2 Rastreo por colonia de actividad antimicrobiana de los péptidos

#### 8.2.1 Subclonamiento de fragmentos codificantes de monómeros y dobles de cecropina con secuencia de péptido señal *pelB*

La actividad antimicrobiana de los péptidos recombinantes fue rastreada mediante el método de rastreo por colonia, que permite estimar la actividad antimicrobiana de los diferentes clones directamente, al utilizar una cepa de *E. coli* "porosa" E609L (Miller et al., 1998). Esta cepa presenta una mutación en una proteína de membrana que hace que sea más permeable y que permite liberar los péptidos desde el espacio periplásmico hacia el medio (Yem y Wu, 1978). Esto facilita la selección de los péptidos recombinantes de mejor eficiencia. Para dirigir los péptidos al espacio periplasmático fue necesario clonar las secuencias codificantes de los monómeros y dobles de cecropina en fase con la secuencia de un péptido señal periplasmática *pelB*. Para el PCR se utilizaron los mismos primers flanqueantes utilizados anteriormente, excepto que en los primers 5' se reemplazó el sitio de restricción NdeI por NcoI. Estos amplicones fueron luego digeridos

con las enzimas de restricción NcoI y BamHI. Luego se procedió de igual manera como antes mencionado en el clonamiento de pET27 y transformación en la cepa BL21 y E609L.

### 8.2.2 Lisogenización de E609L

Para lograr la compatibilidad del sistema de expresión pET27 con la cepa seleccionada *E.coli* E609L de características "porosa", que permitiera la salida de los péptidos expresados si estos llegaban al periplasma, fue necesario lisogenizar la bacteria integrando el profago  $\lambda$ DE3 al cromosoma bacteriano permitiendo así generar la T7 RNA polimerasa que se une al sitio promotor del pET (Studier y Mofatt, 1986; Novy y Morris, 2001). Para ello se utilizó el kit de lisogenización DE3 (Novagen). Se hizo crecer cepa E609L (gentileza de Dr. Kurt Miller) en LB con 0,2% maltosa, 10 mM MgSO<sub>4</sub> y los antibióticos Kanamicina 75  $\mu$ g/ml y tetraciclina 12,5  $\mu$ g/ml a 37°C hasta un OD<sub>600</sub>: 0,5. Se mezclaron 10<sup>8</sup> pfu fago  $\lambda$ DE3, 10<sup>8</sup> pfu fago ayudante y 10<sup>8</sup> pfu fago de selección con 1-10  $\mu$ l de células (para lograr placas con 50-200 colonias). Luego se incubó la mezcla a 37°C por 20 min para permitir la adsorción del fago. Esta mezcla se agregó a placas de LB agar y se esparció en forma homogénea, dejando luego la placa invertida a 37°C toda la noche.

### 8.2.3 Verificación del lisógeno DE3

Para verificar los posibles DE3 lisógenos positivos de *E.coli* E609L, nombrados *E.coli* E609L "LYS", se evaluó la resistencia que tiene la nueva cepa lisógena a una reinfección por el fago de selección (debido a que el profago  $\lambda$ DE3 integrado en la cepa lisógena presenta el mismo grupo de inmunidad con el fago de selección).

### 8.2.4 Expresión de péptidos en E609L "LYS"

Con el fin de probar la capacidad de expresión de ésta cepa, así como la capacidad de liberar el péptido al medio para realizar el rastreo en colonia, una colonia de transformación E609L "LYS" de cada uno de los constructos con pelB fue utilizada para inocular 1 ml LB suplementado con Kanamicina 75  $\mu$ g/ml y tetraciclina 12,5  $\mu$ g/ml a 37° y crecido toda la noche. Al día siguiente 50  $\mu$ l de cada cultivo fueron agregados a 50 ml de LB sin antibióticos e incubados por 2 h hasta alcanzar un OD<sub>600</sub> de 0.6. Después de coleccionar muestras de preinducción, IPTG fue añadido hasta una concentración final 1,0 mM e incubado por 3 h adicionales hasta el muestreo postinducción. Las muestras fueron

sujetas a una centrifugación a 6500 g x 15 min a 4°C, separando el cultivo en fracciones de sobrenadante con el medio y el pellet celular.

#### 8.2.5 Purificación de péptidos en el medio de cultivo y fracción periplasmática

Para la precipitación del medio de cultivo una alícuota de 1 ml del medio fue incubado con 100 µl de ácido tricloroacético (TCA) frío y vortex por 15 s. Se dejó precipitar en hielo por 2 h y centrifugado a 14000 g x 5 min. Se removió el sobrenadante y el pellet se mezcló con 100 µl de acetona. Luego se centrifugó a 14000 g x 5 min. Removiéndose la acetona y dejando pellet secarse al aire y se solubilizó en sample buffer con dodecil sulfato de sodio (SDS) y analizados en geles de poliacrilamida 18% Tris-tricina/Urea. Para la obtención de la fracción periplásmica el pellet celular anterior se resuspendió en 30 ml (Tris-HCl 20 mM, 20% sucrosa, pH: 8). Luego se añadió 60 µl (EDTA 0,5 M, pH: 8) y se dejó agitando por 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 10000 g x 10 min a 4°C y se removió el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 30 ml MgSO<sub>4</sub> 5 mM frío y se dejó agitando 10 min en hielo, liberando las proteínas periplasmáticas al buffer. Luego se centrifugo a 10000 g x 10 min a 4°C separándose el pellet celular con el resto de proteínas celulares y se recuperó 1 ml del sobrenadante con la fracción periplasmática que fue precipitada con TCA como antes mencionado con la precipitación del medio.

#### 8.2.6 Rastreo por colonia

El rastreo por colonia involucra el monitoreo de la liberación de los péptidos recombinantes desde E609L, al cubrir colonias productoras de péptidos con agar, que contiene una cepa bacteriana indicadora, y examinar el césped que cubre por zonas de inhibición de crecimiento. Para ello cultivos de los clones en E609L "LYS" transformadas con DNA de los péptidos híbridos en pET27, fueron crecidas a 37°C hasta saturación toda la noche en medio LB con Kanamicina 75 µg/ml y tetraciclina 12,5 µg/ml. El día siguiente, las células fueron diluidas serialmente en medio nuevo sin antibióticos. Diluciones de 10 µl conteniendo 50-100 células fueron añadidas a 5 ml LB agar derretido, y la mezcla fue vertida a placas petri. Después de solidificado el agar, se vertió 3 ml LB Top agar 0,8% derretido sin células sobre su superficie y se permitió su solidificación, luego las placas fueron incubadas a 37°C por 24 hr hasta que se formaran las colonias. Al día siguiente 5 ml LB agar derretido, que contiene 5 µl de un cultivo de toda la noche de la cepa indicadora *E.coli* además de 1 mM IPTG, para inducir la síntesis de los péptidos, fue vertido sobre cada placa. Las placas fueron incubadas toda la noche a 37°C y se

examinaron por zonas de inhibición del crecimiento alrededor de las colonias de E609L (Miller et al., 1998).

### **8.3 Expresión y purificación de péptidos dobles en sistema heterólogo *E. coli* BL21(DE3)**

#### *8.3.1 Expresión de péptidos en BL21(DE3)*

Colonias simples de *E. coli* BL21(DE3) transformados con los dobles pET/CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> y pET/CEC<sub>ret</sub>-CEC<sub>dir</sub>, y los monómeros pET/CEC<sub>dir</sub> y pET/CEC<sub>ret</sub> fueron usadas para inocular 5 ml LB Broth con 50 µg/ml cloramfenicol, 75 µg/ml estreptomicina y Kanamicina 75 µg/ml a 37°C y crecidas toda la noche. Después 5 ml de cada uno de los cultivos fueron añadidos a 500 ml LB Broth sin selección de antibiótico e incubados por 2 h hasta que OD<sub>600</sub> alcanzó 0,3-0,4. Después la inducción de la expresión del péptido fue realizado con IPTG añadido a los cultivos hasta una concentración final de 0.5 mM e incubado por 4 h hasta el muestreo. Muestras de pellet celular fueron solubilizados directamente en sample buffer con dodecil sulfato de sodio (SDS) y analizados en geles de poliacrilamida 18% Tris-tricina/Urea (Schagger y von Jagow, 1987) y teñidos con azul de coomassie R-250.

#### *8.3.2 Análisis de niveles de expresión por RT-PCR*

RNA total fue extraído de cultivos mediante reactivo TRIZOL (Invitrogen) (Chomczynski y Sacchi, 1987) y tratado con DNAsa RQ1 (Promega). Este RNA libre de DNA fue sometido a transcripción reversa usando Thermoscript RT (Invitrogen). RT fue realizado bajo las siguientes condiciones: RNA fue incubado a 65°C por 5 min y colocada en hielo. Luego se agregó transcriptasa reversa y el primer 3', incubando a 50°C por 1 h. Se incubó a 85°C por 5 min, se colocó en hielo y se le añadió RNAsa H (Invitrogen). Se preparó diluciones seriadas del cDNA sintetizado, se le agregó Taq polimerasa platinum (Invitrogen) y los primers 5' y 3'. PCR fue realizado bajo las siguientes condiciones: 30 ciclos de incubación a 94°C por 30 seg, 55°C por 30 seg, 72°C por 45 seg, y una incubación final a 72°C por 10 min. Los productos RT-PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa (2%).

### 8.3.3 Purificación y recuperación de péptidos de extracto celular

Los cultivos fueron separados por centrifugación a 7000 g x 10 min a 4°C en pellet celular y fracción sobrenadante. Pellet celulares fueron tratados con buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, Triton X-100, pH 8), lisozima (100 µg/ml) y vortexeado, incubado a temperatura ambiente por 30 min, sujetas a sonicación en hielo (3x20 s) y centrifugación a 11000g x 30 min a 4°C para separar las fracciones solubles e insolubles. El pellet de la fracción insoluble con cuerpos de inclusión fue solubilizado en buffer de Guanidina (Guanidina-HCl 6 M, Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8) y mantenido a 4°C por 12 h. Para promover el plegamiento de los péptidos solubilizados (1,5 ml) fueron añadidos lentamente a la solución de Guanidina 0,6 M (13,5 ml) alcanzando una concentración final de Guanidina-HCl 1,1 M en 15 ml. Las muestras fueron mantenidas con agitación moderada por 3 h a 4°C y luego centrifugadas a 11000 g por 30 min a 4°C.

### 8.3.4 Purificación de péptidos por HPLC

Muestras fueron purificadas mediante cromatografía de interacción hidrofóbica en columnas Sep-Pak C-18® preequilibradas con agua acidificada (ácido trifluoracético o TFA 0.05% en agua ultrapura o UPW) y lavado con agua acidificada y eluida con 5 y 80% acetonitrilo (ACN). Fracciones eluidas fueron liofilizadas y reconstituidas en UPW. Proteínas totales fueron determinadas mediante el ensayo del ácido bicinconínico (BCA) (Pierce) (Smith et al., 1985). Fracciones del 80% ACN Post-Sep-Pak fueron analizadas en geles de poliacrilamida 18% Tris-tricina/Urea para confirmar la identidad del péptido y teñido con azul de coomassie.

Purificación adicional fue realizada mediante HPLC en fase reversa (RP-HPLC) modelo LaChrom D-7000 y fue monitoreado por absorción UV a 225 nm. El eluido del 80% Post-Sep-Pak fue cargado en una columna Sephasil C-18 (250 x 4.1 mm) (LiChroCART). Péptidos fueron eluidos con un gradiente lineal de ACN (5-60%) con agua acidificada 0.1% TFA por 90 min a un flujo de 0.6 ml/min. Fracciones fueron recolectadas cada dos min, liofilizadas, resuspendidas en UPW y congelada a -20°C hasta el ensayo antimicrobiano. Fracciones Post-HPLC fueron analizadas en geles de poliacrilamida 18% Tris-tricina/Urea para confirmar la identidad del péptido y teñido con azul de coomassie.

### 8.3.5 Caracterización de péptidos por MALDI-TOF y ESI MS/MS

Bandas teñidas con azul de coomassie fueron cortados y el 50% de la banda fue digerida con tripsina usando una ProteineerDP (Bruker, Bremen, Germany) como descrito (Paradela y Albar, 2006). Después de la digestión parte de la muestra fue analizada en un espectrómetro de masa MALDI-TOF Bruker Reflex IV (Brucker Daltonics, Bremen, Germany). La muestra restante fue disuelta en ESI buffer A (ácido acético 0,5% en agua) y cargada en columna I.D. empaquetado con perlas C18 (IntegraFrit, New Objective, Woburn, MA) y fraccionado con un gradiente lineal de 5-30% ESI buffer B (acetonitrilo 90%, ácido acético 0,5% en agua) a un flujo de 500 nL/min. Péptidos eluidos de columna fueron analizados en espectrómetro de masa con trampa iónica HCT ultra (Brucker Daltonics, Bremen, Germany) obteniéndose un espectro de fragmentación que fue comparado las bases de datos de NCBI nr usando el motor de búsqueda MASCOT (gentileza de Dr. Alberto Paradela y Dr. Luis Mercado). MALDI-TOF y ESI MS/MS fue realizado en los laboratorios de la facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

### 8.3.6 Ensayo antibacteriano

La actividad antibacteriana de los péptidos fue monitoreada mediante ensayo de inhibición de crecimiento líquido (Mitta et al. 1999). El método involucra medir el efecto de los péptidos antimicrobianos sobre el crecimiento de las bacterias patógenas mediante la determinación de turbidez en un lector de microplacas.

Para ello se incubó durante 24 horas, a la temperatura de crecimiento de la bacteria, una alícuota de 10  $\mu$ l de los péptidos antimicrobianos a distintas concentraciones con una suspensión de 100  $\mu$ l de medio con bacterias en fase exponencial, que presenta un  $OD_{620}$ : 0.001, en una microplaca de 96 pocillos. Al final de este periodo se midió la absorbancia a un  $OD_{620}$  (Mitta et al., 1999). El porcentaje de inhibición fue determinado mediante la resta del crecimiento bacteriano en ausencia del péptido del mostrado por bacterias expuestas a diferentes concentraciones del péptido.

### 8.3.7 Ensayo antifúngico

Similarmente se midió el efecto antifúngico de los péptidos antimicrobianos sobre el crecimiento de hongos mediante un ensayo de inhibición de crecimiento líquido (Mitta et al. 1999) en microplaca de 96 pocillos. Para ello 80  $\mu$ l de esporas fúngicas a una concentración final de  $10^4$  esporas/ml fueron incubados con 20  $\mu$ l del péptido a diferentes

concentraciones, en una microplaca con tetraciclina 10 µg/ml y 10 µg/ml estreptomicina por 30 min a temperatura ambiente y se midió absorbancia a OD<sub>595</sub>. Luego se incubó durante 72 h adicionales en presencia de luz, a temperatura ambiente. Al final de este periodo se midió la absorbancia a un OD<sub>595</sub> (Mitta et al., 1999).

**8.3.8 Cepas microbianas y condiciones de crecimiento utilizadas ensayos antimicrobianos**  
Las bacterias evaluadas en los ensayos antibacterianos fueron *Micrococcus luteus* (ATCC 4698) y *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 49461) como referencia de bacterias gram positivas. *Vibrio parahemoliticus* (gentileza de Dr. Romilio Espejo), *Vibrio mimicus*, *Enterobacter aerogenes*, *Edwardsiella tarda* (gentileza de Dr. Ana María Baya), *Vibrio ordalii* (BIOS Chile), *Vibrio anguillarum* (ATCC 19106), *Vibrio alginolyticus* (ATCC 19108), *Escherichia coli* (ATCC 11303), y *Aeromonas hydrophila* (ATCC 23213) como referencia de bacterias gram negativas. Todas las bacterias fueron crecidas en TSB (Trypticase Soy Broth), excepto *V. parahemoliticus*, *V. mimicus*, *V. Anguillarum* y *V.alginolyticus* que fueron crecidas en Peptona NaCl Broth. La temperatura de crecimiento fue de 26°C para todos los *vibrios* y 37°C para las restantes bacterias. El hongo *Saprolegnia sp.* fue crecida en GYB (Glucosa Yeast Broth) a temperatura ambiente.

## **8.4 Expresión de péptidos dobles mediante inducción con fago CE6**

### **8.4.1 Expresión de péptidos mediante inducción con fago CE6**

El fago lambda CE6 fue utilizado para suministrar T7 RNA polimerasa a células BL21 (sin DE3) y al vector pET dirigido por el promotor T7, permitiendo así un control más fuerte de la expresión proteica, importante en el caso de expresión de péptidos muy tóxicos, dado que no hay T7 RNA polimerasa en la célula hasta el momento mismo de la inducción (Studier y Moffat, 1986). Para la expresión de los péptidos colonias simples de *E. coli* BL21(sin DE3) transformados con los dobles pET/CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> y pET/CEC<sub>ret</sub>-CEC<sub>dir</sub>, y los monómeros pET/CEC<sub>dir</sub> y pET/CEC<sub>ret</sub> fueron crecidas en LB con 0,2% maltosa y los antibióticos 50 µg/ml cloramfenicol, 75 µg/ml estreptomicina y Kanamicina 75 µg/ml a 37°C hasta alcanzar un OD<sub>600</sub> 0,6-1,0. Se añadió MgSO<sub>4</sub> hasta una concentración final de 10 mM momento que se puso en contacto con el stock de fago CE6 para inducir la expresión a una concentración final de 2-4x10<sup>9</sup> pfu/ml (para asegurar una multiplicidad de

infección (MOI) de 5-10. Se continuo creciendo las células infectadas por 3 h adicionales y se procedió a recuperar las células por centrifugación.

#### 8.4.2 Preparación de fagos CE6

Para el mantenimiento del stock de fago a una alta titulación fue necesario realizar una amplificación o crecimiento del fago. Para ello se transfirió una colonia de *E.coli* LE392 (que expresa *supF* para suprimir la mutación de lisis *Sam7*) en 5 ml de LB suplementado con maltosa 0,2% y  $MgSO_4$  10 mM hasta un  $OD_{600}$ :1,0. Se mezcló 5 ml de estas células con  $2 \times 10^8$  partículas de fago y se incubó a 37°C por 15 min sin agitación. Se agregó esta mezcla a un matraz con 500 ml LB suplementado con maltosa 0,2% y 10 mM  $MgSO_4$  y se dejó agitando hasta que se observó lisis (alrededor de 5 h). Se agregó 5 ml cloroformo al matraz y se dejó agitando por 10 min adicionales. La centrifugación a 10000 g por 10 min a 4°C permitió recuperar el sobrenadante con los fagos. Se añadió dimetil sulfóxido hasta una concentración final del 7% y se guardaron los fagos a -80°C hasta el ensayo de titulación o la expresión de proteínas.

#### 8.4.3 Titulación de fagos CE6

Para la titulación del stock de fago se transfirió una colonia de LE392 (Stratagene) en LB con maltosa 0,2% y se incubó por 4-6 h sin sobrepasar un  $OD_{600}$  de 1,0. Las bacterias fueron centrifugadas a 1000 g x 10 min y luego se resuspendieron en 10 mM  $MgSO_4$  y fueron diluidas a un  $OD_{600}$ : 0,5. Se prepararon diluciones del stock del fago 1:100, 1:1000, 1:10000. Se añadió 1  $\mu$ l de cada dilución a 200  $\mu$ l de células LE392 diluidas a  $OD_{600}$ :0,5 y se dejo incubar por 15 min para permitir la adsorción del fago a las células. Luego se mezcló con 3 ml de LB top agar derretido, pero enfriado alrededor de 48°C y se plaqueó sobre placas de LB agar precalentadas. Se permitió que las placas se solidificaran y se dejaron incubando a 37°C en forma invertida. A las 6-8 h se hicieron visibles las calvas que fueron contadas para estimar la titulación (Sambrook et al., 1989).

## **8.5 Evaluación de citotoxicidad de los péptidos**

La citotoxicidad de los péptidos fue evaluada sobre la línea celular de salmón CHSE-214, derivada de tejido renal embrionario de salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Lannan et al., 1984). Para ello monocapas de células cultivadas (Spector et al., 1998a) en medio mínimo esencial (MEM) más suero fetal de bovino (FBS) a 17°C (Lannan et al., 1984), en placas de 24 pocillos, fueron incubadas por 3 h con diferentes concentraciones de los péptidos (1,5-7,5 µg/µl) por triplicado y luego fueron lavadas 3x con PBS (buffer fosfato salino) contadas al microscopio de contraste de fases, en una cámara de Neubauer para determinar un eventual efecto citopático (Mercado et al., 2005). El posible efecto citopático se evaluó soltando las células de la matriz plástica por tripsinización con tripsina 0,1% con EDTA (Spector et al., 1998a). Las células fueron centrifugadas a 10000 g x 20 min y fueron resuspendidas en 200 µl de PBS. De esta dilución se tomó 100 µl y se mezcló con 100 µl de azul de tripan y se dejó incubar por 5 min. Luego se contabilizó el número total de células recuperadas y se determinó la viabilidad de las mismas, mediante el método de exclusión del colorante azul de tripan, que difunde al interior de células muertas, pero que se excluye de aquellas no alteradas (Spector et al., 1998a). Células sin incubar con los péptidos, se utilizaron como control. El número de células viables (que no incorporan colorante) en relación al total de células recuperadas, fue el indicador comparativo para definir toxicidad.

## **8.6 Expresión y purificación de péptidos dobles en sistema de fusión con inteína**

### *8.6.1 Subclonamiento de fragmentos codificantes de monómeros y dobles de cecropina en sistema inteína y su transformación en E.coli*

La expresión de proteínas con un proteína e fusión ha resultado en buenos rendimientos de producción, pero estos métodos requieren el uso de clivaje químico o enzimático para liberar el péptido de su pareja de fusión (Morasutti et al., 2005). Se utilizó una aproximación, que usa la inteína Sce VMA como pareja de fusión (Chong et al., 1996; Chong et al., 1997), para la expresión y purificación de proteínas citotóxicas sin afectar las células hospederas que producen el péptido recombinante y que induce su propia escisión de su pareja de fusión (Perler et al., 1994).

Las secuencias codificantes de CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub>, CEC<sub>ret</sub>-CEC<sub>dir</sub>, CEC<sub>dir</sub> y CEC<sub>ret</sub> fueron subclonados en el vector de expresión pTYB11 (New England BioLabs), mediado por inteina. Plásmido en que la transcripción de los genes clonados esta controlado por el promotor T7 lac y que permite fusión de gen a la secuencia codificante de la inteina Sce VMA (IMPACT-CN). Para ello se amplificó por PCR utilizando partidores específicos usando como templado de amplificación se utilizó los distintos miniprep de plasmidios pET27 con CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub>, CEC<sub>ret</sub>-CEC<sub>dir</sub>, CEC<sub>dir</sub> y CEC<sub>ret</sub>. Para la amplificación de CEC<sub>dir</sub> fueron utilizados el primer 5' (5'-GGTGGTGCTCTTCCAACGGGTGGCTGAAGAAA-3') con sitio de restricción SapI y el primer 3' (5'-GGTGGTGAATTCTCATCAACCTCGGGCAGTTGCG-3') con sitio de restricción EcoRI. Para amplificar CEC<sub>ret</sub> fueron utilizados el primer 5' (5'-GGTGGTGCTCTTCCAACGGTCGAGCCACTGCAG-3') y el primer 3' (5'-GGTGGTGAATTCTCATCACCCCCACAGCTTTTTTA-3'). Para amplificar CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> fueron utilizados el primer 5' (5'-GGTGGTGCTCTTCCAACGGGTGGCTGAAGAAA-3') y el primer 3' (5'-GGTGGTGAATTCTCATCACCCCCACAGCTTTTTTA-3'). Para amplificar CEC<sub>ret</sub>-CEC<sub>dir</sub> fueron utilizados el primer 5' (5'-GGTGGTGCTCTTCCAACGGTCGAGCCACTGCAG-3') y el primer 3' (5'-GGTGGTGAATTCTCATCAACCTCGGGCAGTTGCG-3'). PCR fue realizado con Taq polimerasa platinum (Invitrogen) bajo las siguientes condiciones: incubación a 94°C por 10 min, 30 ciclos de incubación a 94°C por 30 seg, 55-60°C por 30 seg, 72°C por 45 seg, y una incubación final de 72°C por 10 min. Los amplicones obtenidos fueron analizados mediante electrotroforesis en gel de agarosa 2%. Una vez obtenidos los amplicones estos fueron digeridos con las enzimas de restricción SapI y EcoRI y ligadas a pTYB11 (previamente digerido con SapI y EcoRI).

Los productos de ligación de los distintos clones fueron utilizados para transformar células competentes de *E.coli* TOP10 para la mantención y amplificación de los plasmidios. La ligación y transformación de TOP10 fue analizada mediante PCR de colonias y electrotroforesis en gel de agarosa 2%. Las células TOP10 fueron sujetas a miniprep para la transformación de la cepa de expresión *E.coli* ER2566 (New England BioLabs), así como para la secuenciación de los distintos clones. La transformación de ER2566 fue analizada mediante PCR de colonias y electrotroforesis en gel de agarosa 2%.

### 8.6.2 Expresión de péptidos en ER2566

Para la expresión de colonias simples de *E. coli* ER2566 transformados con los dobles pTYB11/CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> y pTYB11/CEC<sub>ret</sub>-CEC<sub>dir</sub>, y los monómeros pTYB11/CEC<sub>dir</sub> y pTYB11/CEC<sub>ret</sub> fueron usadas para inocular 4 ml LB Broth con el antibiótico ampicilina 100 µg/ml a 37°C y crecidas toda la noche. Después 4 ml de cada uno de los cultivos fueron añadidos a 400 ml LB Broth con antibiótico e incubados por 3-4 h hasta que OD<sub>600</sub> alcanzó 0,5-0,8. Después la inducción de la expresión del péptido fue realizado con IPTG añadido a los cultivos hasta una concentración final de 0.3 mM e incubado por 16 h a 22°C hasta el muestreo.

Las muestras fueron separadas por centrifugación a 5000 g x 10 min a 4°C en pellet celular y fracción sobrenadante. Pellet celulares fueron resuspendidos y tratados con 25 ml buffer de lisis (Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, Triton X-100 0,1%, inhibidor de proteasa PMSF 20 µM y lisozima 20 µg/ml, pH 8), e incubados a 4°C por 1 h. Luego células fueron centrifugadas a 11000g x 30 min a 4°C y fracciones de sobrenadante fueron recuperadas.

### 8.6.3 Western blot de péptidos de fusión

Para confirmar la naturaleza de la proteína de fusión pTYB11/CEC<sub>dir</sub> fue sometida a western blot. El método involucra la separación de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y transferencia a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Inmobilon P, Millipore), tratada previamente con metanol, mediante semi-dry blotting (Ausebel et al., 1999). Esta membrana fue bloqueada con albúmina sérica bovina (BSA) 3% por 1 h y luego lavada con PBS. Después la membrana fue hibridada con un anticuerpo primario de conejo específico del dominio de unión a quitina (New England BioLabs) y fue lavada 3 x en PBS con tween20 0,05% eliminando el anticuerpo no unido. Después se incubó con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP), que se une específicamente al anticuerpo primario y luego lavada 3 x en PBS con tween20 0,05%. Para su detección visual se utilizó 3,3-diaminobenzidina (DAB) (Pierce) que forma un precipitado coloreado sobre la membrana en el lugar de la enzima.

#### *8.6.4 Purificación de péptidos por cromatografía de afinidad*

Fracciones de sobrenadante fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad en columnas con 6 ml de quitina (New England BioLabs) preequilibradas con buffer de columna (Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, 1 mM EDTA, pH 8). Columnas fueron cargadas con el extracto clarificado a un flujo de 0,5 ml/min, luego se lavó columna con 60 ml buffer de columna a un flujo de 1-2 ml/min. Luego se provocó la inducción del clivaje añadiendo un flujo rápido de 18 ml buffer de clivaje (Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, 1 mM EDTA, DTT 30 mM, pH 9) y se dejó incubar a 18°C por 40 h. Péptidos fueron eluidos con 18 ml buffer de columna, y fracciones recolectadas. Se saco una muestra de 200 µl de la columna de quitina remanente y se mezcló con 100 µl SDS 3x, luego se hirvió por 5 min y se recuperó el sobrenadante para verificar eficiencia de corte. Ensayos preliminares de cromatografía en columnas de quitina fueron realizados en el Departamento de Ciencias Agrarias y Ambientales de la Universidad de Udine, Italia.

#### *8.6.5 Purificación de péptidos por HPLC*

Muestras fueron adicionalmente purificadas mediante cromatografía de interacción hidrofóbica en columnas Sep-Pak C-18® preequilibradas con agua acidificada y lavado con agua acidificada y eluida con 5, 40 y 80% ACN. Fracciones eluidas fueron liofilizadas y reconstituidas en UPW. Proteínas totales fueron determinadas mediante el ensayo del ácido bicinconínico (BCA). Muestras fueron analizadas en geles de poliacrilamida 18% Tris-tricina/Urea y teñidos con azul de coomassie R-250.

Purificación adicional fue realizada mediante HPLC en fase reversa (RP-HPLC) modelo LaChrom D-7000. El eluido del 40 y 80% Sep-Pak fue cargado en una columna Sephasil C-18 (250 x 4.1 mm) (LiChroCART). Péptidos fueron eluidos con un gradiente lineal de ACN (5-60%) con agua acidificada 0.1% TFA por 90 min a un flujo de 0.6 ml/min. Fracciones fueron recolectadas cada dos min, liofilizadas, resuspendidas en UPW y congelada a -20°C hasta el ensayo antimicrobiano. Fracciones Post-HPLC fueron analizadas en geles de poliacrilamida 18% Tris-tricina/Urea para confirmar la identidad del péptido y teñido con azul de coomassie.

## 9. RESULTADOS

Para la creación de las moléculas dobles propuestas se diseñó considerando el orden invertido de los tripletes de nucleótido codificantes de los aminoácidos que conforman la cecropina (figura 9.1), dado que la simple inversión de la secuencia de DNA no lograba este propósito. Este nuevo gen de la retrocecropina fue generado por GenScript.

**CEC<sub>dir</sub> (secuencia nucleotídica)**

GGG TGG CTG AAG AAA ATT GGC AAG AAA ATC GAA CGC GTT GGT CAG CAC ACT CGG GAT GCC ACA  
ATC CAG GGA CTG GGA ATC GCT CAA CAA GCC GCC AAT GTC GCC GCA ACT GCC CGA GGT



**CEC<sub>ret</sub> (secuencia nucleotídica)**

GGT CGA GCC ACT GCA GCC GTC AAT GCC GCC CAA CAA GCT ATC GGA CTG GGA CAG ATC ACA GCC  
GAT CGG ACT CAC CAG GGT GTT CGC GAA ATC AAA AAG GGC ATT AAA AAG CTG TGG GGG



**CEC<sub>dir</sub> (secuencia aminoacídica)**

**GWLKKIGKKIERVQGHTRDATIQGLGIAQQAANVAATARG**

**CEC<sub>ret</sub> (secuencia aminoacídica)**

**GRATAAVNAAQQAIGLGQITADRTHQGVRKIKKGIKLLWG**

Figura 9.1 Diseño de síntesis de secuencia codificante de péptido invertido de cecropina. Secuencia nucleotídica y aminoacídica de CEC<sub>dir</sub> y CEC<sub>ret</sub>

Este nuevo gen en conjunto con el parental fueron amplificados exitosamente obteniéndose los amplicones de cecropina y retrocecropina (figura 9.2) en su forma de secuencia madura, sin las secuencias prepro que caracterizan a los AMPs (Xanthopoulos et al., 1988; Boman et al., 1989).

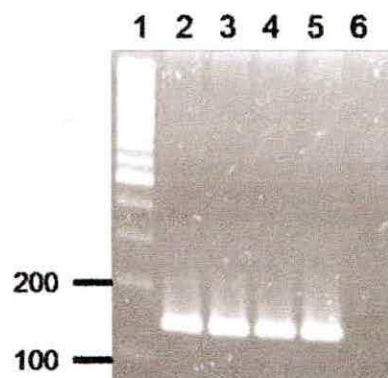
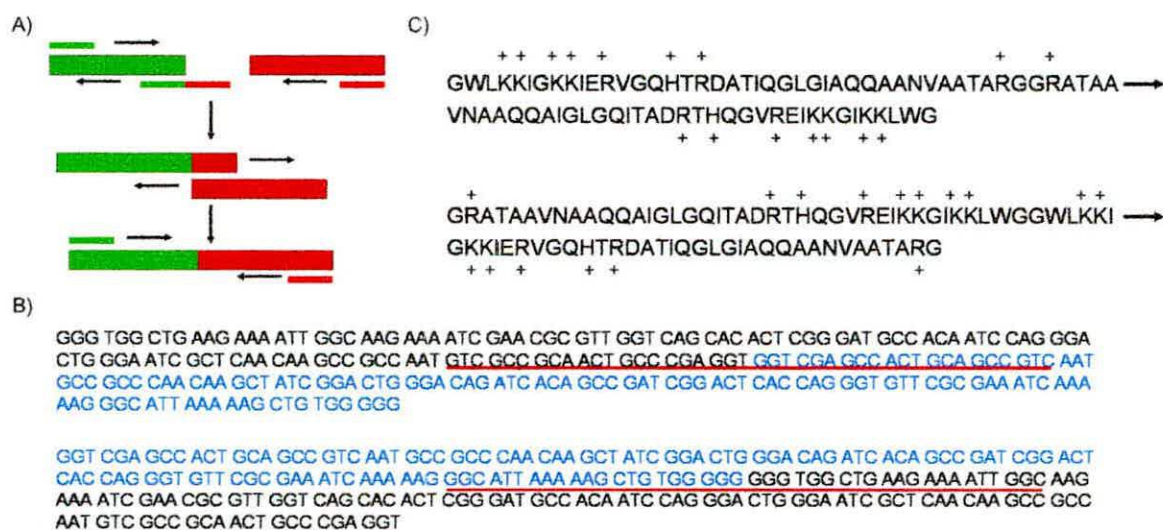


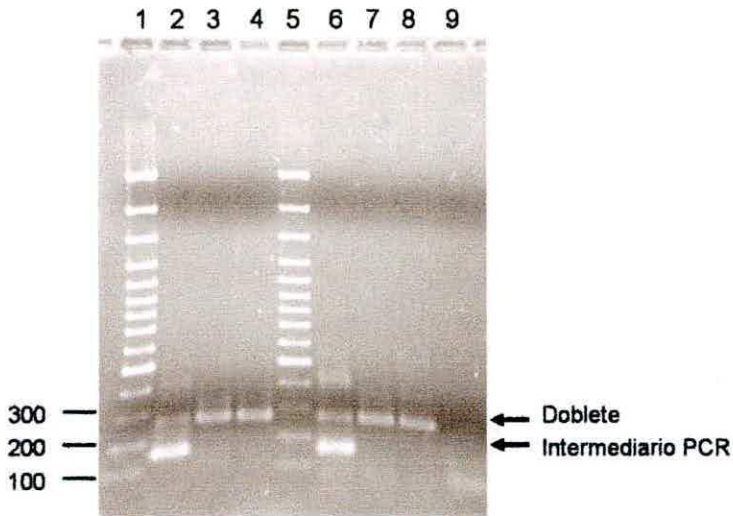
Figura 9.2 PCR de cecropina y retrocecropina. Productos PCR resueltos a través de electroforesis en gel de agarosa (2%). Carril 1: escalera de DNA 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp (Winkler), Carril 2-3: Amplificación de CEC<sub>dir</sub>, Carril 4-5: Amplificación de CEC<sub>ret</sub>, Carril 6: Control negativo.

Los dobletes CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> y CEC<sub>ret</sub>-CEC<sub>dir</sub> (figura 9.3B) fueron construidos por medio de PCR dirigido por tres primers (figura 9.3A) para así combinar la orientación de los aminoácidos cargados e hidrofóbicos de la cecropina. En este sentido, el doblete CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> fue generado por la unión en fase de CEC<sub>dir</sub> con CEC<sub>ret</sub>, lo que implica que el péptido doblete muestra sus aminoácidos con carga positiva hacia los extremos y las colas hidrofóbicas hacia el interior (figura 9.3C). De igual manera, el doblete CEC<sub>ret</sub>-CEC<sub>dir</sub> se combinó en fase CEC<sub>ret</sub> con CEC<sub>dir</sub>, orientando así sus aminoácidos con carga hacia el interior y las colas hidrofóbicas hacia los extremos (figura 9.3C). El doblete en tandem de CEC<sub>dir</sub> en fase con CEC<sub>dir</sub> no fue construido basado en información previa de que carecía de actividad (Martemyanov et al., 1997).



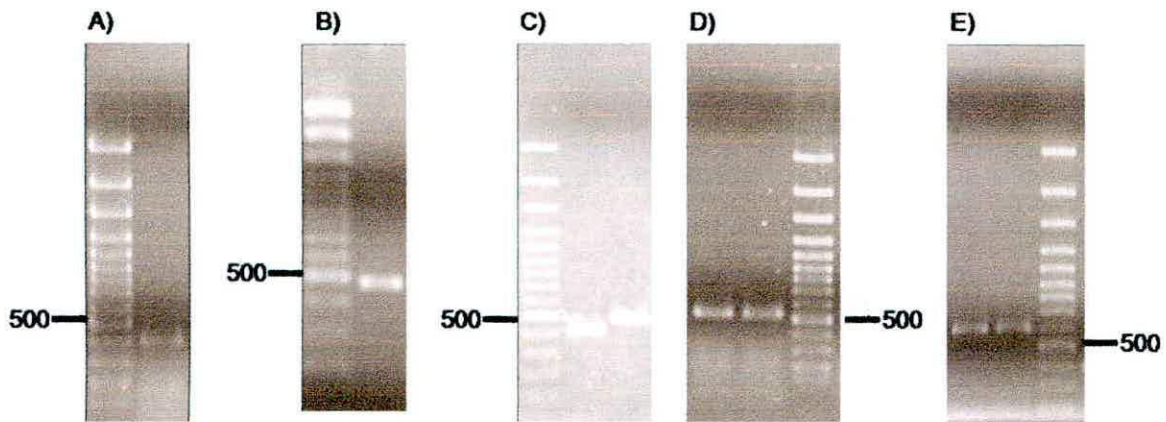
**Figura 9.3 Diseño y secuencia de de dobletes de cecropina.** (A) Reacción de PCR dirigida por tres primers con primer híbrido (rojo-verde) y primers flanqueantes (rojo o verde). Templados de DNA están en cajas roja o verde. (B) Diseño de construcción de dobletes CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> (panel superior) y CEC<sub>ret</sub>-CEC<sub>dir</sub> (panel inferior): usando CEC<sub>dir</sub> (en negro) y CEC<sub>ret</sub> (en azul) como templados. Secuencia del primer híbrido usado para la fusión esta subrayado en rojo. El codón de inicio ATG esta omitido de la figura. (C) Esquema de secuencia aminoacídica de dobletes de cecropina CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> (panel superior) y CEC<sub>ret</sub>-CEC<sub>dir</sub> (panel inferior) en orientación amino a carboxi terminal. Residuos de amino ácidos cargados positivamente están ilustrados mediante símbolo (+). Metionina inicial es omitida de figura.

En la figura 9.4 en carriles 3-4 y 7-8 se puede observar un producto de amplificación del tamaño esperado de la secuencia codificante, con sitios de restricción incorporados, de los dobletes (264 pb). Se puede observar también la dependencia de la concentración del primer híbrido y la importancia de mantener su concentración limitante (0,1  $\mu\text{M}$ ) para obtener los dobletes correspondientes. De la misma manera cuando la concentración no es limitante se produce la formación de intermediarios de PCR (carriles 2 y 6 respectivamente).



**Figura 9.4 Perfil PCR de dobletes de cecropina.** PCR de CEC<sub>ret</sub>-CEC<sub>dir</sub> (a la izquierda) y CEC<sub>ret</sub>-CEC<sub>dir</sub> (a la derecha) generados por PCR dirigido por tres primers a diferentes concentraciones (10, 1, 0.1  $\mu\text{M}$ ) del primer híbrido resueltos a través de electroforesis en gel de agarosa (2%). Carriles 1,5: escalera de DNA (Winkler) (bp), Carriles 2-4: CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> a concentraciones de 10, 1 y 0.1  $\mu\text{M}$  del primer híbrido. Carriles 6-8: CEC<sub>ret</sub>-CEC<sub>dir</sub> a concentraciones 10, 1 y 0.1  $\mu\text{M}$  del primer híbrido, Carril 9: control negativo. La banda tenue debajo de los 100 bp corresponde a dímeros de primer.

Una vez obtenido las secuencias codificantes de los monómeros y dobletes, estos fueron clonados en el vector pET27b dirigido por el promotor T7lac, y transformados en células de *E.coli* TOP10 (figura 9.5), donde su correcto marco de lectura y secuencia fue confirmado por secuenciación.



**Figura 9.5 Transformación de monómeros y dobletes de cecropina en TOP10.** pET27 de monómeros y dobletes con y sin pelB fueron utilizados para transformar TOP10. PCR de colonias resistentes a kanamicina fueron resueltas a través de electroforesis en gel de agarosa (2%). (A) pET27 sin pelB, Carril 1: escalera de DNA (Winkler) (bp), Carril 2: CEC<sub>dir</sub>. (B) pET27 con pelB, Carril 1: escalera de DNA (Winkler) (bp), Carril 2: CEC<sub>dir</sub>. (C) pET27 sin y con pelB, Carril 1: escalera de DNA (Winkler) (bp), Carril 2: CEC<sub>ret</sub> sin pelB, Carril 3: CEC<sub>ret</sub> con pelB. (D) pET27 sin pelB, Carril 1: CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub>, Carril 2: CEC<sub>ret</sub>-CEC<sub>dir</sub>, Carril 3: escalera de DNA (Winkler) (bp). (E) pET27 con pelB, Carril 1: CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub>, Carril 2: CEC<sub>ret</sub>-CEC<sub>dir</sub>, Carril 3: escalera de DNA (Winkler) (bp).

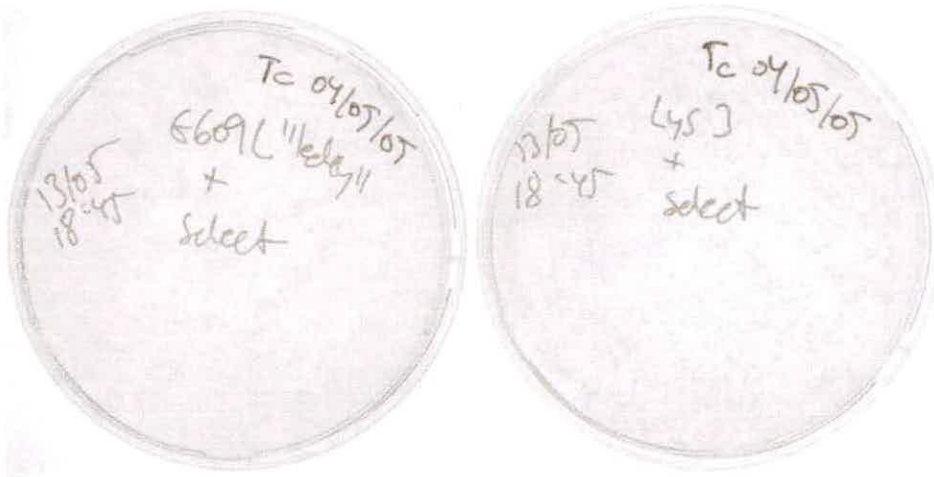
La actividad antimicrobiana de los péptidos recombinantes fue rastreada mediante el método de rastreo por colonia, que permite estimar la actividad antimicrobiana de los diferentes clones directamente. Para ello se subclonó los monómeros y dobletes en pET27b en fase con una secuencia señal periplasmática pelB (figura 9.6). El correcto marco de lectura y secuencia fue confirmado por secuenciación.



**Figura 9.6 Diseño de clonamiento con y sin secuencia señal periplasmática en pET27.** Monómeros y dobletes de cecropina fueron clonados en pET27 con (NcoI y BamHI) o sin (NdeI y BamHI) secuencia señal pelB.

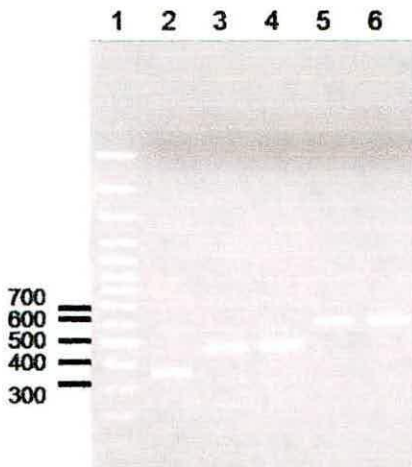
La cepa E609L (Miller et al., 1998) se lisogenizó exitosamente con el fago ( $\lambda$ DE3) permitiendo la incorporación del lysogen DE3. Las colonias seleccionadas mostraron resistencia a una reinfección por el fago de selección (figura 9.7) verificando así la integración del lisógeno (debido a que el profago  $\lambda$ DE3 integrado en la cepa lysógena presenta el mismo grupo de inmunidad con el fago de selección). Esto a diferencia del

control no sometido a lisogenización que fue lisada en su totalidad por el fago de selección.



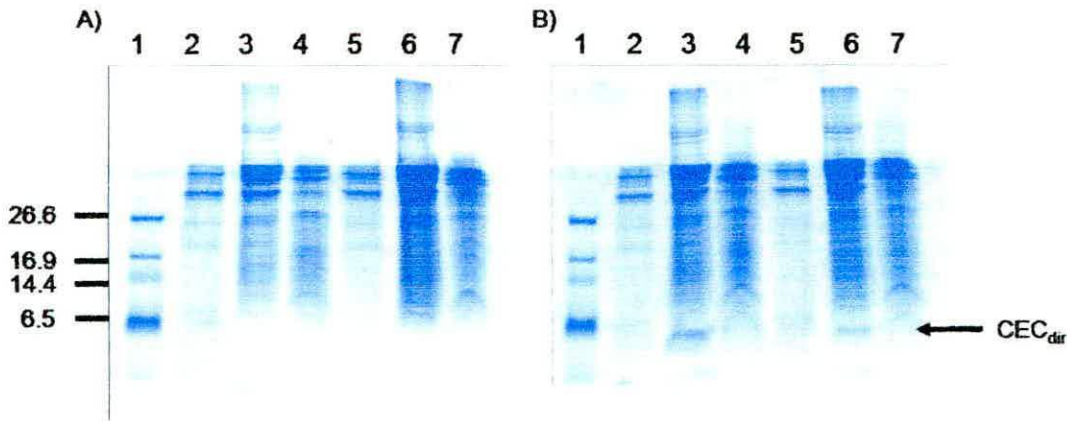
**Figura 9.7 Selección de lysógenos de E609L.** *E.coli* E609L sin (izquierda) y con lysogenización previa (derecha) sometidos a la reinfección con fago de selección.

Se obtuvieron colonias transformantes PCR positivas de *E.coli* E609L "LYS" del tamaño esperada para los monómeros y dobletes en pET27b con pelB (figura 9.8) que fueron luego utilizadas con el fin de probar la capacidad de expresión de ésta cepa, así como la capacidad de liberar el péptido al medio.



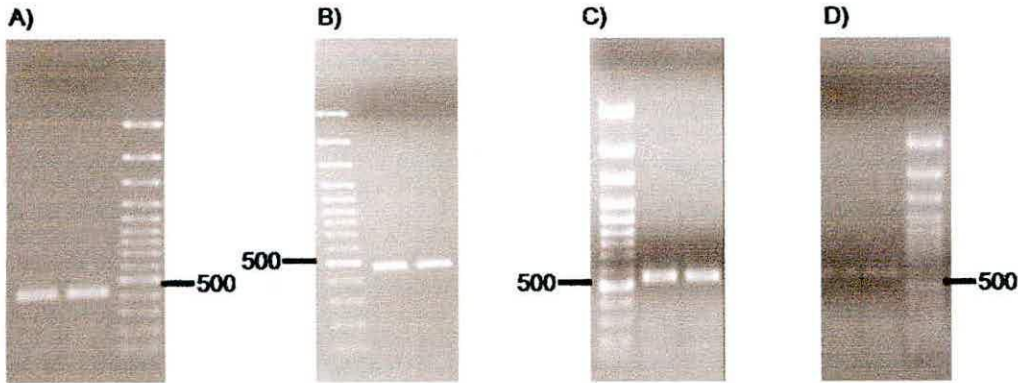
**Figura 9.8 Transformación de monómeros y dobletes de cecropina en E609L "LYS".** pET27 de monómeros y dobletes con pelB fueron utilizados para transformar E609L "LYS". PCR de colonias resistentes a kanamicina fueron resueltas a través de electroforesis en gel de agarosa (2%). Carril 1: escalera de DNA (Winkler) (bp), Carril 2: pET27 sin inserto, Carril 3: pET con CEC<sub>dir</sub>, Carril 4: pET con CEC<sub>ret</sub>, Carril 5: pET con CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub>, Carril 6: pET con CEC<sub>ret</sub>-CEC<sub>dir</sub>.

En la figura 9.9 en carril 3 se puede observar la expresión de un péptido en *E.coli* E609L "LYS" con un peso molecular acorde al de cecropina con pelB, sin embargo también se observa que esta cepa presenta una alta expresión basal como se puede ilustrar en carril 6, dado que hubo expresión en ausencia de IPTG. La purificación de las diferentes fracciones celulares: total, periplasmático y el medio de cultivo indicó que en esta cepa la expresión lograda sólo se observó en el pellet celular (carril 3) y no así en el espacio periplasmático (carril 4 y 7) como tampoco en el medio de cultivo (carril 2 y 4). Esto indica la ausencia de transporte del péptido expresado al espacio periplasmático a pesar del péptido señal pelB. Esto fue confirmado luego cuando las distintas bacterias transformantes de los péptidos fueron rastreadas mediante el sistema de rastreo en colonia, donde no se apreció la formación de halos de inhibición alrededor de las colonias productoras de los péptidos antimicrobianos.



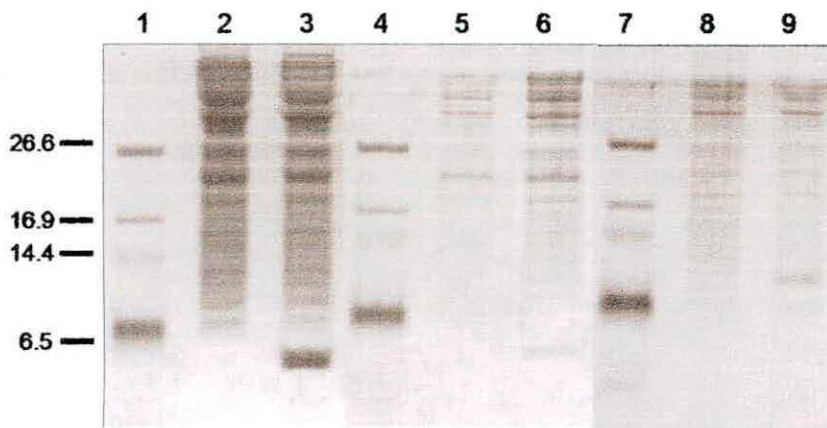
**Figura 9.9 Perfil de expresión de cecropina en E609L"LYS".** Total, Periplasmática y medio. Expresión de CEC<sub>dir</sub> con pelB desde células E609L"LYS"/pET27 inducidas con IPTG, resueltas a través de electroforesis Tris-tricina / Urea (18%). (A) *E.coli* E609L"LYS"/pET27 sin inserto, Carril 1: Marcador de peso molecular 26.6, 16.9, 14.4 y 6.5 kDa (Bio-Rad), Carril 2: medio cultivo precipitado, inducido con IPTG, Carril 3: Pellet celular, inducido con IPTG, Carril 4: fracción periplasmática precipitada, inducido con IPTG, Carril 5: medio cultivo precipitado, sin IPTG, Carril 6: Pellet celular, sin IPTG, Carril 7: fracción periplasmática precipitada, sin IPTG. (B) *E.coli* E609L "LYS"/pET27 con CEC<sub>dir</sub>, Carril 1: Marcador de peso molecular 26.6, 16.9, 14.4 y 6.5 kDa, Carril 2: medio cultivo precipitado, inducido con IPTG, Carril 3: Pellet celular, inducido con IPTG, Carril 4: fracción periplasmática precipitada, inducido con IPTG, Carril 5: medio cultivo precipitado, sin IPTG, Carril 6: Pellet celular, sin IPTG, Carril 7: fracción periplasmática precipitada, sin IPTG.

Para la óptima expresión de los monómeros y dobletes construidos se transformó exitosamente células de *E. coli* BL21(DE3) (figura 9.10), cepa que ya es DE3 lisógena. La razón de no utilizar la cepa "porosa" de *E. coli* para expresar los péptidos, fue que la naturaleza de esta cepa sólo le permite ser útil para el rastreo de péptidos antimicrobianos más eficientes, pero no así para la producción, dado que estos mutantes son frágiles y revierten prontamente (Jonasson et al., 2002).



**Figura 9.10 Transformación de monómeros y dobletes de cecropina en BL21(DE3).** pET27 de monómeros y dobletes con y sin pelB fueron utilizados para transformar BL21(DE3). PCR de colonias resistentes a kanamicina fueron resueltas a través de electroforesis en gel de agarosa (2%). (A) pET27 sin pelB, Carril 1: CEC<sub>dir</sub>, Carril 2: CEC<sub>ret</sub>, Carril 3: escalera de DNA (Winkler) (bp). (B) pET27 con pelB, Carril 1: escalera de DNA (Winkler) (bp), Carril 2: CEC<sub>dir</sub>, Carril 3: CEC<sub>ret</sub>. (C) pET27 sin pelB, Carril 1 escalera de DNA (Winkler) (bp), Carril 2: CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub>, Carril 3: CEC<sub>ret</sub>-CEC<sub>dir</sub>. (D) pET27 con pelB, Carril 1: CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub>, Carril 2: CEC<sub>ret</sub>-CEC<sub>dir</sub>, Carril 3: escalera de DNA (Winkler) (bp).

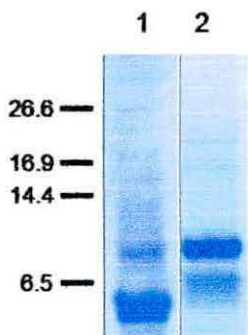
En la figura 9.11 se muestra el perfil de expresión obtenido en células de BL21(DE3) con constructos en pET27 con pelB, observándose la expresión de péptidos del tamaño esperado para CEC<sub>dir</sub> y CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> (carriles 3, 6) y uno algo menor para CEC<sub>ret</sub> (carril 9) fueron obtenidos con la inducción con IPTG, estando ausente en células sin inducción (carriles 2, 5 y 8) demostrando así un control mayor de la expresión basal que la cepa E609L"LYS".



**Figura 9.11 Perfil de expresión de monómeros y dobletes de cecropina con péptido señal pelB.**

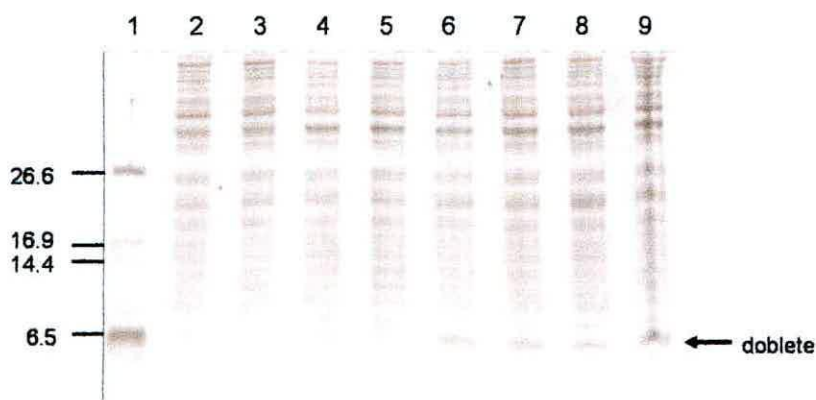
Expresión de CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> desde células BL21/pET27 con pelB inducidas con IPTG, resueltas a través de electroforesis Tris-tricina / Urea (18%). Carril 1, 4, 7: Marcador de peso molecular (Bio-Rad) (kDa), Carril 2: Control (BL21 con pET27 CEC<sub>dir</sub> sin inducción con IPTG), carril 3: BL21 con pET27 CEC<sub>dir</sub> con IPTG, carril 5: Control (BL21 con pET27 CEC<sub>ret</sub> sin inducción con IPTG), carril 6: BL21 con pET27 CEC<sub>ret</sub> con IPTG, carril 8: Control (BL21 con pET27 CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> sin inducción con IPTG), carril 9: BL21 con pET27 CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> con IPTG.

El primer paso de purificación después de la extracción involucró el desalteo de CEC<sub>dir</sub> y CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> mediante cromatografía en fase sólida Sep-Pak eluido con 80% ACN. En la figura 9.12 se muestra el enriquecimiento y purificación de los péptidos.



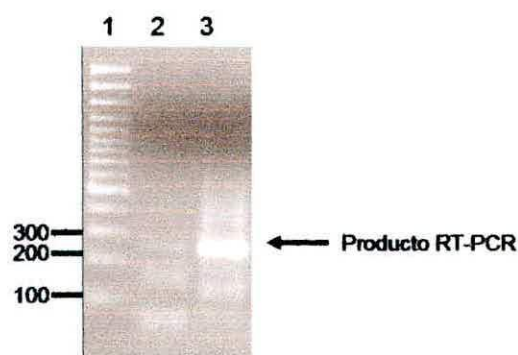
**Figura 9.12 Purificación de cecropina y doblete con pelB por Sep-Pak.** Proteínas extraídas desde cultivos de BL21(DE3) con pET27/CEC<sub>ret</sub> y CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> con pelB inducidas con IPTG, fueron purificadas por Sep-Pak con gradiente de ACN y resueltas a través de electroforesis Tris-tricina / Urea (18%). Carril 1: Fracción CEC<sub>dir</sub> eluido con 80% ACN, Carril 2: Fracción CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> eluido con 80% ACN.

Así mismo en la figura 9.13 se muestra el perfil de expresión obtenido en células de BL21(DE3) con CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> en pET27 sin pelB a diferentes tiempos de inducción y temperatura. CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> fue el único en que se pudo observar expresión sin pelB, obteniéndose un péptido del orden de los 8,5 kDa esperado.



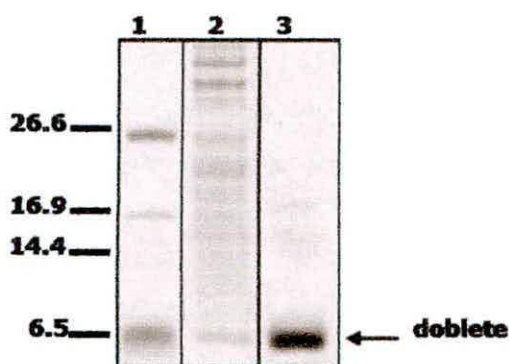
**Figura 9.13 Perfil de expresión de doblete de cecropina sin pelB.** Expresión de CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> desde células BL21/pET27 inducidas con IPTG, resueltas a través de electroforesis Tris-tricina / Urea (18%). Carril 1: Marcador de peso molecular (Bio-Rad) (kDa), Carril 2,3: Control (BL21 con pET27 CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> sin inducción con IPTG) a 37 y 26°C por 6 hrs incubación respectivamente, Carril 4,5: BL21 con pET27 CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> a 37 y 26°C con inducción de IPTG por 2 hrs, Carril 6,7: BL21 con pET27 CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> a 37 y 26°C con 4 hrs de inducción con IPTG, Carril 8,9: BL21 con pET27 CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> a 37 y 26°C con 6 hrs de inducción con IPTG.

Esta expresión también se verificó mediante el RT-PCR dirigido a la secuencia codificante de CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> obteniéndose una amplificación de los cultivos inducidos con IPTG (figura 9.14).



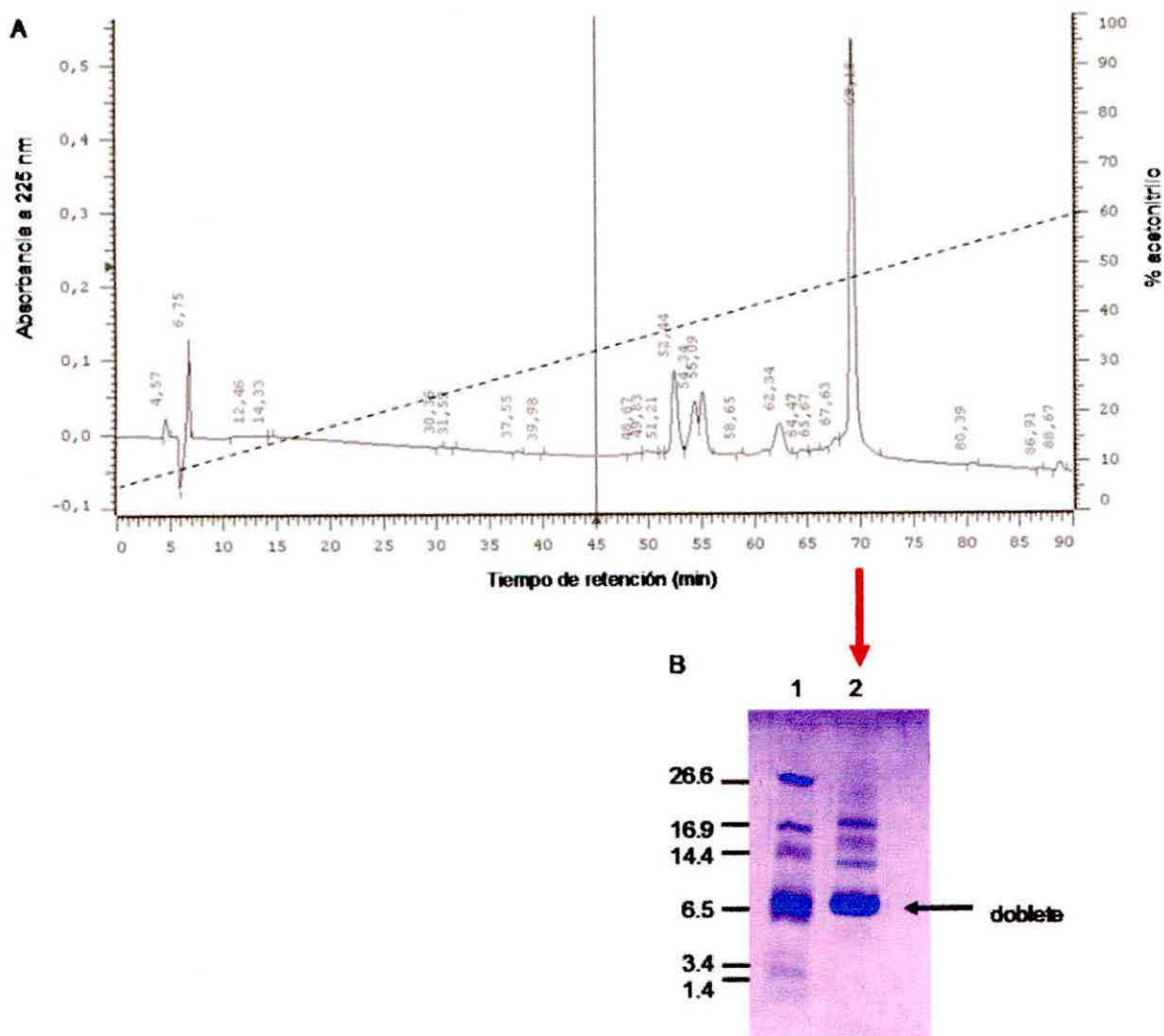
**Figura 9.14 Perfil de expresión mediante RT-PCR de cultivos de doblete de cecropina.** RNA de cultivos de BL21(DE3) con pET27/CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> inducido con IPTG, tratado con DNAsa y sometido a RT-PCR. Producto RT-PCR fue resuelto a través de electroforesis en gel de agarosa (2%). Carril 1: escalera de DNA (Winkler) (bp), Carril 2: Control RT-PCR negativo, sin transcriptasa reversa, Carril 3: RT-PCR con transcriptasa reversa.

La purificación mediante Sep-pak del péptido CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> permitió su enriquecimiento (figura 9.15). Además permitió ver que en el citosol se acumuló una fracción mínima del péptido soluble (carril 2) y que la mayoría estaba presente en cuerpos de inclusión (carril 3).



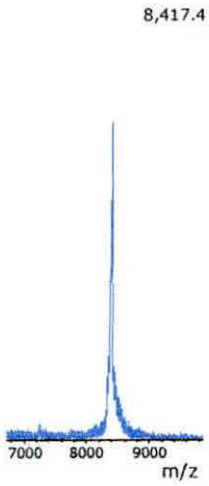
**Figura 9.15 Purificación de doblete por Sep-Pak.** Proteínas extraídas desde cultivos de BL21(DE3) con pET27/CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> inducidas con IPTG, fueron purificadas por Sep-Pak con gradiente de ACN y resueltas a través de electroforesis Tris-tricina / Urea (18%). Carril 1: Marcador de peso molecular (Bio-Rad) (kDa), Carril 2: Fracción citosólica, Carril 3: Fracción cuerpos de inclusión.

La segunda etapa de purificación involucró RP-HPLC obteniéndose un peak a los 69,18 min en un 47,5% ACN (figura 9.16A) que se confirmó mediante electroforesis que fuera el mismo péptido (figura 9.16B). Una muestra de este péptido fue enviada y se sometió a una determinación de masa que confirmó su identidad.



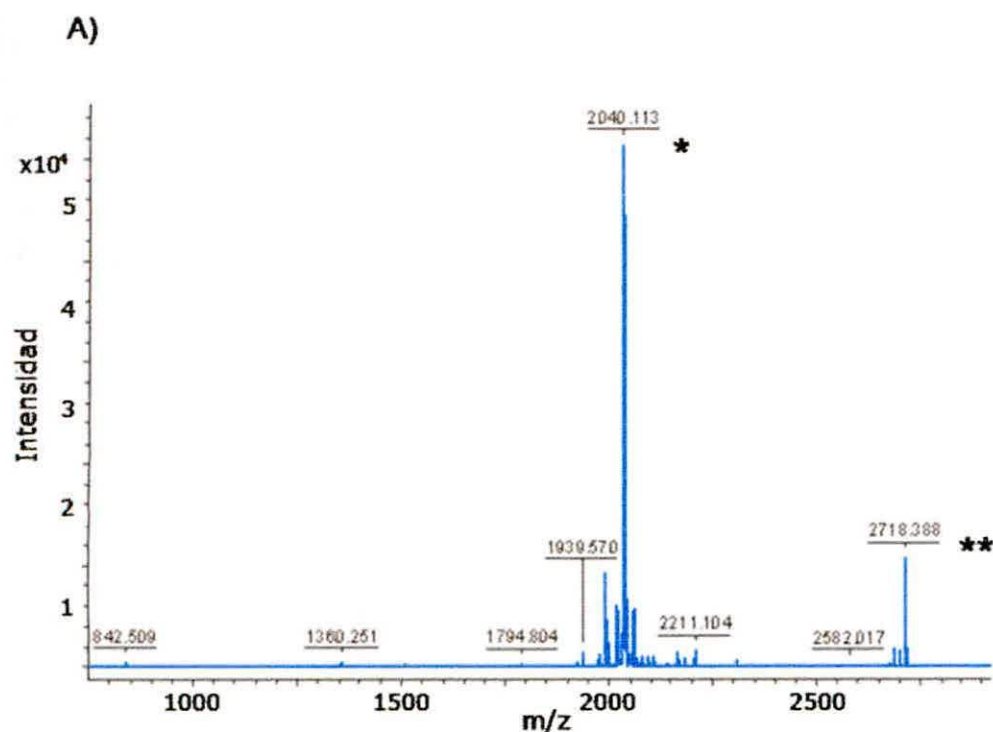
**Figura 9.16 Purificación de doblete por RP-HPLC.** (A) Perfil de elución de RP-HPLC de la fracción del 80% ACN post Sep-Pak C-18 con un gradiente lineal de 5-60% ACN. (B) Perfil de proteínas resuelto a través de gel de electroforesis Tris-tricina/ Urea (18%). Carril 1: Marcador de peso molecular (Bio-Rad) (kDa), Carril 2: Eluido del peak del cromatograma con un tiempo de retención de 69,18 min que corresponden al doblete CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub>.

En la figura 9.17 se muestra el espectro de masa obtenido por MALDI-TOF MS, que estimó el peso molecular del péptido en 8,417.4 Da, acorde con lo esperado.



**Figura 9.17 Espectro MALDI-TOF MS de doblete.** Determinación de masa del peak mayor del cromatograma obtenido de RP-HPLC, que corresponde al doblete  $CE_{dir}$ - $CE_{ret}$

La correspondencia de la secuencia primaria fue determinada mediante una digestión trípica donde se obtuvieron varios fragmentos, de los cuales dos fueron predominantes de 2.040 y 2.718 (figura 9.18A). La digestión trípica hipotética de 4 fragmentos mostró una secuencia primaria acorde con  $CE_{dir}$ - $CE_{ret}$  (figura 9.18B). La real naturaleza del péptido fue determinada por una fragmentación de masa del fragmento de 2.040 mediante espectrómetro de masa con trampa iónica.



B)

Fragmentos de Digestión trípica hipotética			
m/z	Comienzo	final	Secuencia
1067.5962	65	73	(R) THQGVREIK (K)
1095.6023	11	19	(K) IERVGQHTR (D)
2040.0838	44	64	(R) ATAAVNAAQQAIGLGQITADR (T) *
2040.0838	20	40	(R) DATIQGLGIAQQAANVAATAR (G) *
2310.2278	41	64	(R) GGRATAAVNAAQQAIGLGQITADR (T)
2310.2278	20	43	(R) DATIQGLGIAQQAANVAATARGGR (A)
2718.4399	44	70	(R) ATAAVNAAQQAIGLGQITADRTHQGV (E) **
2718.4399	14	40	(R) VGQHTRDATIQGLGIAQQAANVAATAR (G) **

Figura 9.18 Análisis MALDI-TOF MS de digestión trípica total de doblete. (A) \*/\*\* Indican Pesos moleculares acorde a lo esperado para las secuencias y espectro de fragmentación. (B) Digestión hipotética de CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub>

La figura 9.19 A y B muestra que los aminoácidos 20 a 64 corresponden a las secuencias invertidas de CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub>.

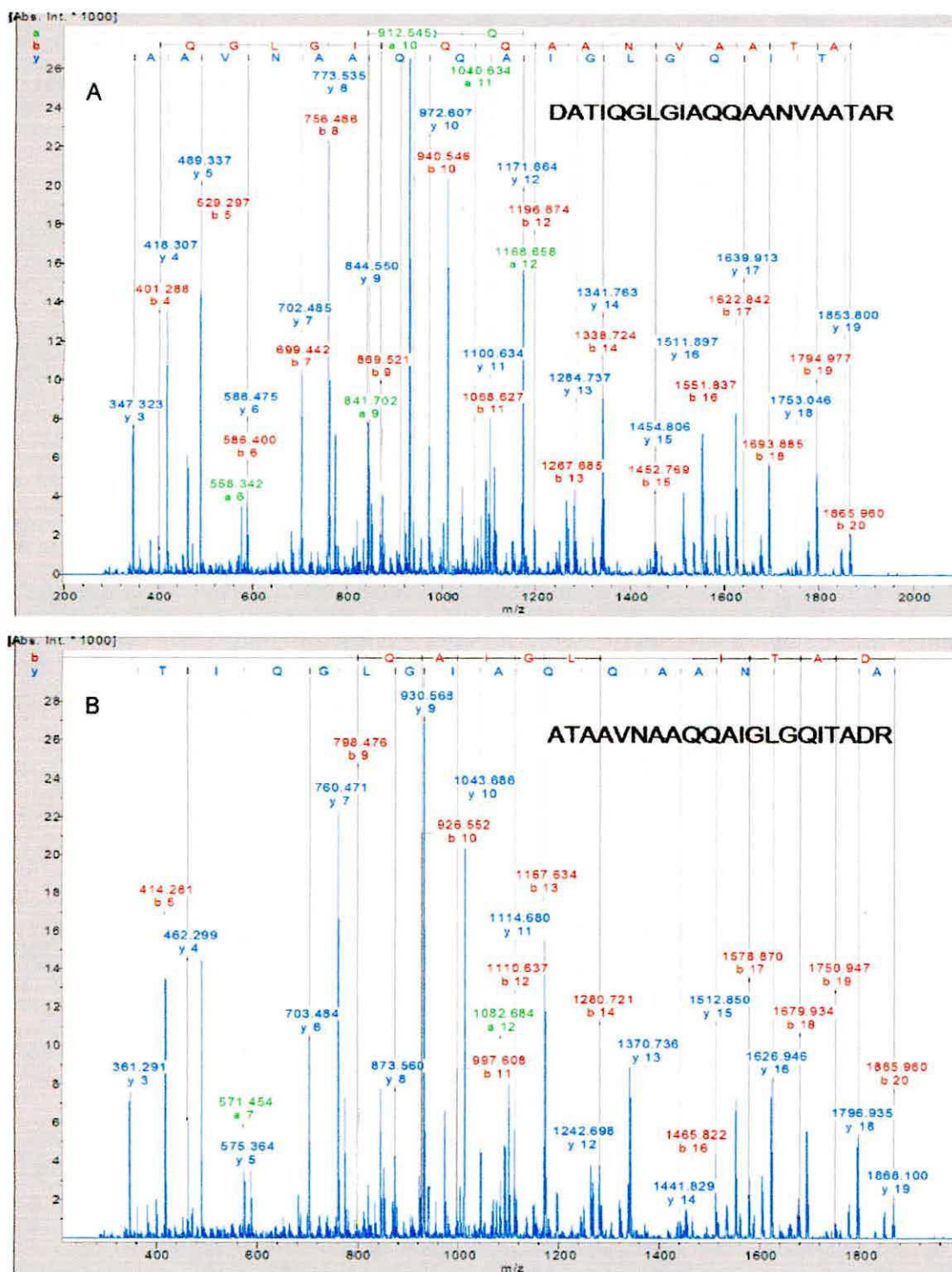


Figura 9.19 Fragmentación por Espectrometría de masa provisto con trampa iónica del peak 2040.1 de la degradación triptica. (A) y (B) indican que los aminoácidos 20 a 64 corresponden a las secuencias invertidas de CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub>

El péptido CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> purificado mediante RP-HPLC fue utilizado para ensayos antimicrobianos contra bacterias gram negativas y positivas, así como sobre hongos mostrando una actividad aumentada del orden del micromolar y mayor rango de acción en comparación con el control de cecropina sintética (Tabla 9.1). El mismo péptido con peIB mostró una actividad reducida en el orden de 10 (datos no mostrados).

**Tabla 9.1** Perfil antimicrobiano *in vitro* de fracción post-HPLC de CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> aislado de BL21, comparado con CEC<sub>dir</sub> obtenido por síntesis química (f-moc).

	MIC (µM)	
	CEC <sub>dir</sub> -CEC <sub>ret</sub>	CEC <sub>dir</sub>
<b>Bacterias gram negativas</b>		
<i>V. ordalii</i>	1,08	2,16
<i>V. anguillarum</i>	1,08	2,16
<i>V. alginolyticus</i>	1,08	2,16
<i>V. mimicus</i>	2,16	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	2,16	-
<i>E. coli</i>	1,08	-
<i>E. aerogenes</i>	1,08	2,16
<i>E. tarda</i>	-	-
<b>Bacterias gram positivas</b>		
<i>B. subtilis</i>	-	-
<i>S. epidermidis</i>	-	-
<i>M. luteus</i>	1,08	-
<b>Hongos</b>		
<i>Saprolegnia sp.</i>	0,17	-

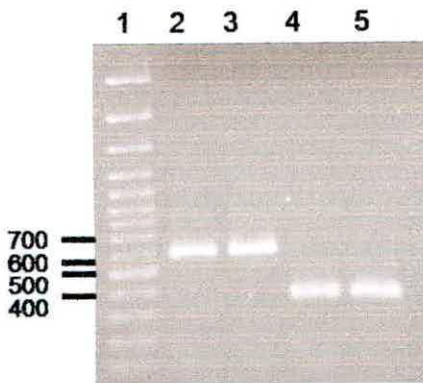
MIC esta dado por valores IC<sub>50</sub> (µM), (-): No hubo actividad detectable a la concentración ensayada.

Para confirmar la ausencia de citotoxicidad el péptido fue incubado con células CHSE-214 (Lannan et al., 1984). La viabilidad de las células fue demostrada mediante el método de exclusión del colorante azul de tripan, donde el péptido no mostró citotoxicidad sobre células eucarióticas (CSE-214) por al menos una concentración 10 veces la concentración de la inhibición bacteriana (Tabla 9.2).

**Tabla 9.2** Ensayo *in vitro* de citotoxicidad de doblete CECdir-CECret aislado de BL21, comparado con CECdir obtenido por síntesis química, en la línea celular CHSE-214.

Concentración de péptido	% viabilidad
<b>CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> (µg/µl)</b>	
1,5	94
3,0	91
6,0	93
7,5	95
<b>CEC<sub>dir</sub> (µg/µl)</b>	
1,5	84
3,0	73
6,0	50
7,5	27

Células BL21(sin DE3) se transformaron en forma exitosa con los constructos (figura 9.20), que pudieran ser infectados por el fago lambda CE6 para suministrar T7 RNA polimerasa a células.



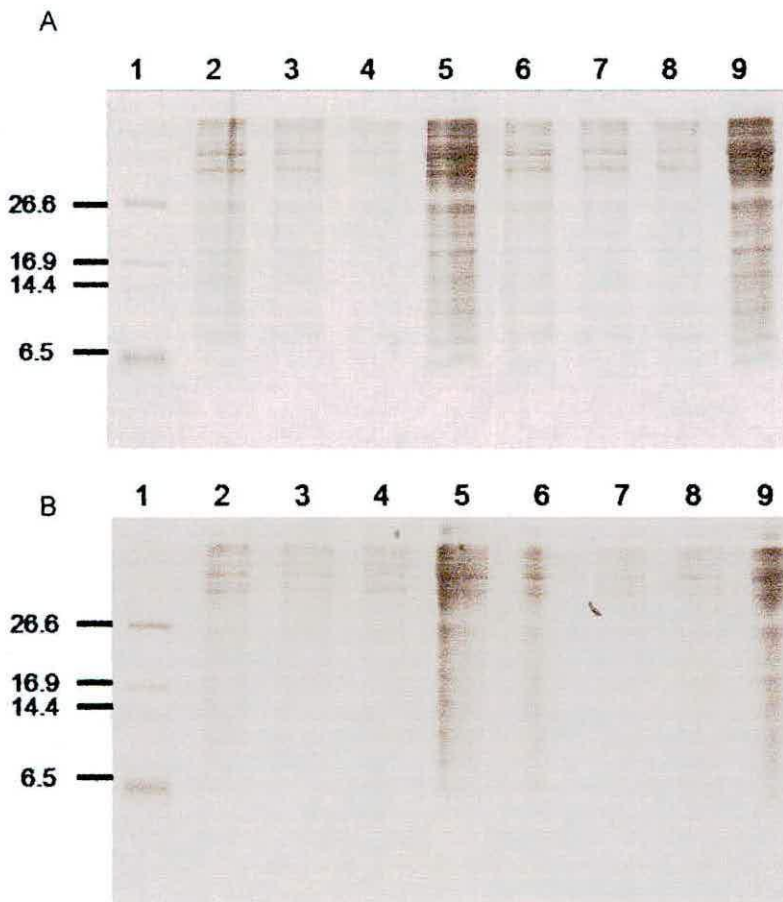
**Figura 9.20** Transformación de monómeros y dobletes de cecropina en BL21 (sin DE3). pET27 de monómeros y dobletes con pelB fueron utilizados para transformar BL21 (sin DE3). PCR de colonias resistentes a kanamicina fueron resueltas a través de electroforesis en gel de agarosa (2%). Carril 1: escalera de DNA (Winkler) (bp), Carril 2: CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub>, Carril 3: CEC<sub>ret</sub>-CEC<sub>dir</sub>, Carril 4: CEC<sub>dir</sub>, Carril 5: CEC<sub>ret</sub>

Se amplificó el fago CE6 para tener las cantidades adecuadas para una expresión, obteniéndose una titulación del orden de  $5 \times 10^9$  pfu/ml (figura 9.21).



**Figura 9.21 Titulación de infección de células LE392 con fago lambda CE6.** Estrategia de titulación para determinar multiplicidad de infección (MOI) de fago lambda CE6.

Se indujo la expresión de células BL21 (sin DE3) con diluciones seriadas del fago para tener diferentes multiplicidad de infección (MOI), sin embargo el sistema probó no ser adecuado para la expresión de estos péptidos (figura 9.22A y B)

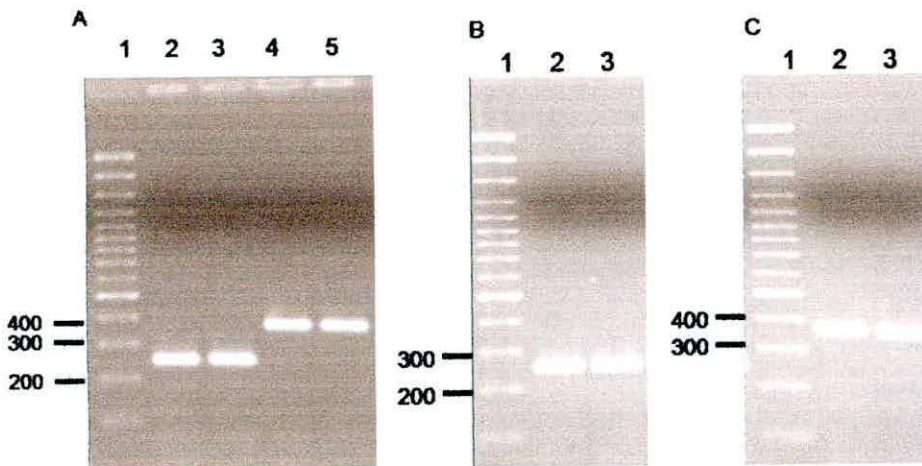


**Figura 9.22 Perfil de expresión de monómeros y dobletes de cecropina (BL21 sin DE3).** Expresión de CEC<sub>dir</sub> y CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> con pelB desde células BL21/pET27 infectadas con fago lambda CE6 a diferentes MOI, resuelta a través de electroforesis Tris-tricina / Urea (18%). (A) CEC<sub>dir</sub> Carril 1: Marcador de peso molecular (Bio-Rad) (kDa), Carril 2-4: CEC<sub>dir</sub> con (MOI: 1, 5, 10), Carril 6-8: CEC<sub>dir</sub> con (MOI 15, 20, 25), Carril 5, 9: control CEC<sub>dir</sub> sin infección. (B) CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> Carril 1: Marcador de peso molecular (Bio-Rad) (kDa), Carril 2-4: CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> con (MOI: 1, 5, 10), Carril 6-8: CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> con (MOI: 15, 20, 25), Carril 5, 9: control CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> sin infección.

Se utilizó una aproximación, que usa la inteína Sce VMA como pareja de fusión (Chong et al., 1996; Chong et al., 1997). Los monómeros y dobletes en pET27 fueron subclonados en el vector pTYB11 (figura 9.23) y se transformó en forma exitosa células TOP10 y ER2566 (figura 9.24).

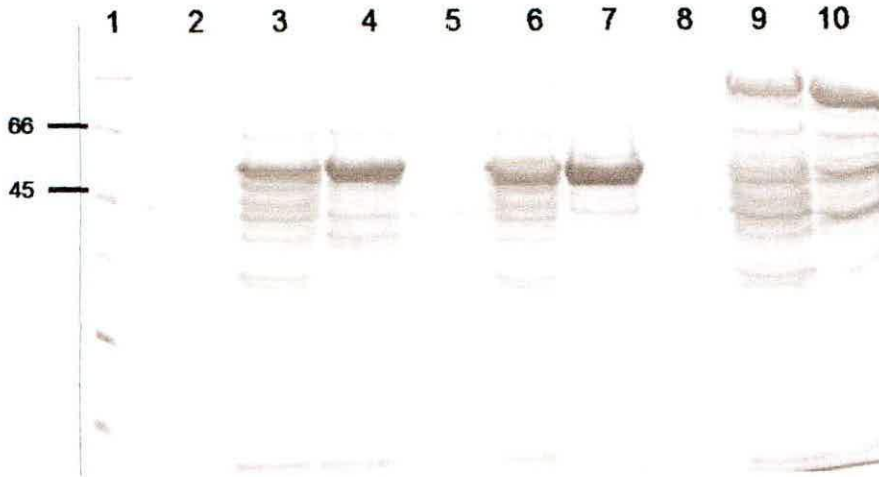


**Figura 9.23 Diseño de clonamiento en pTYB11.** Monómeros y dobletes de cecropina fueron clonados en pTYB11 con (SspI y EcoRI). Este presenta un dominio de unión a quitina (CBD).



**Figura 9.24 Transformación de monómeros y dobletes de cecropina en TOP10 y ER2566.** pTYB11 de monómeros y dobletes fueron utilizados para transformar TOP10 y ER2566. PCR de colonias resistentes a kanamicina fueron resueltas a través de electroforesis en gel de agarosa (2%). (A) TOP10, Carril 1: escalera de DNA (Winkler) (bp), Carril 2: CEC<sub>dir</sub>, Carril 3: CEC<sub>ret</sub>, Carril 4: CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub>, Carril 5: CEC<sub>ret</sub>-CEC<sub>dir</sub>. (B) ER2566, Carril 1: escalera de DNA (Winkler) (bp), Carril 2: CEC<sub>dir</sub>, Carril 3: CEC<sub>ret</sub>. (C) ER2566, Carril 1: escalera de DNA (Winkler) (bp), Carril 2: CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub>, Carril 3: CEC<sub>ret</sub>-CEC<sub>dir</sub>.

En la figura 9.25 se puede observar la expresión de la proteína de fusión inteína-CEC<sub>dir</sub> de tamaño esperado 59,2 kDa con IPTG (carril 4) y su expresión basal sin IPTG (carril 3). Como control de expresión se expresó la proteína de unión a maltosa de 97 kDa (carril 8-10).



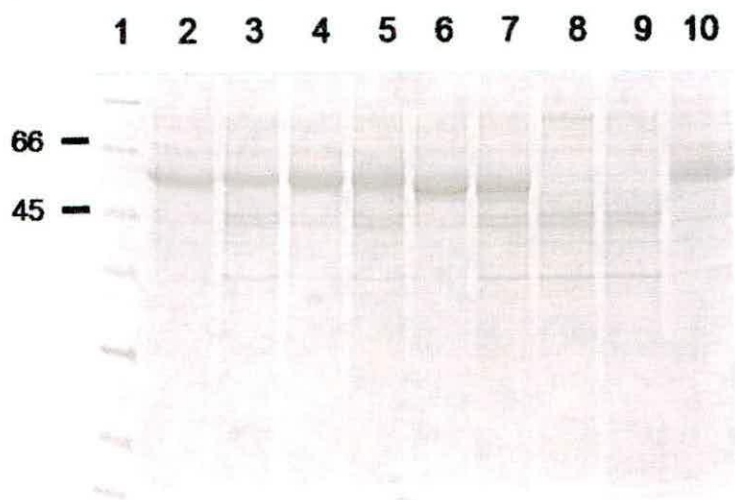
**Figura 9.25 Perfil de expresión de cecropina (ER2566).** Expresión de CEC<sub>dir</sub> desde células ER2566/pTYB11 inducidas con IPTG, resueltas a través de electroforesis Tris-tricina / Urea 12% Carril 1: Marcador de peso molecular (Bio-Rad) (kDa), Carril 2-4: CEC/pTYB11 (t: 0, t: 16 hrs sin IPTG, t: 16 hrs con IPTG 0.3 mM), Carril 5-7: pTYB11 sin fragmento (t: 0, t: 16 hrs sin IPTG, t: 16 hrs con IPTG 0.3 mM), Carril 8-10: pMYB5 (t: 0, t: 16 hrs sin IPTG, t: 16 hrs con IPTG 0.3 mM).

En la figura 9.26 se pudo apreciar la diferencia de tamaño con su control (PTYB11 sin inserto, en carril 3) que es de 55 kDa contra los 59,2 kDa (PTYB11 CEC<sub>dir</sub>, en carril 2).



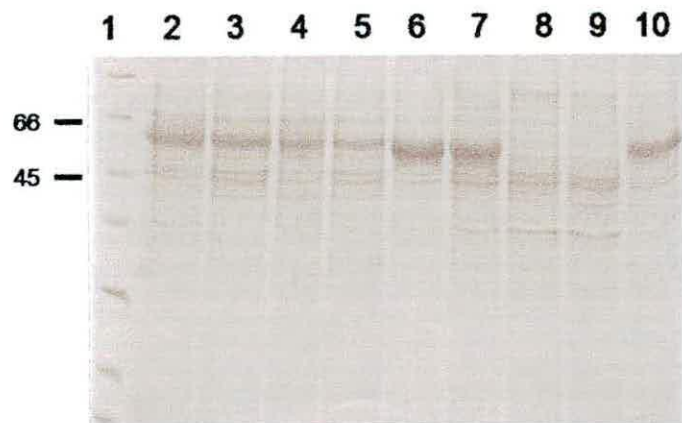
**Figura 9.26 Perfil de expresión de cecropina (ER2566).** Expresión de CEC<sub>dir</sub> desde células ER2566/pTYB11 inducidas con IPTG, resueltas a través de electroforesis Tris-tricina / Urea 8% Carril 1: Marcador de peso molecular (Bio-Rad) (kDa), carril 2, 5 y 8: CEC/pTYB11, carril 3, 6 y 9: pTYB11 sin fragmento, carril 4 y 7: pMYB5. Carriles 2-4 t=16 hrs con IPTG 0.3 mM, carril 5-7 t= 16 hrs sin IPTG, carril 8-9 t:=0)

Se obtuvo los mismos resultados con el retro péptido CEC<sub>ret</sub>, obteniéndose una proteína estimada de 59,2 (figura 9.27).



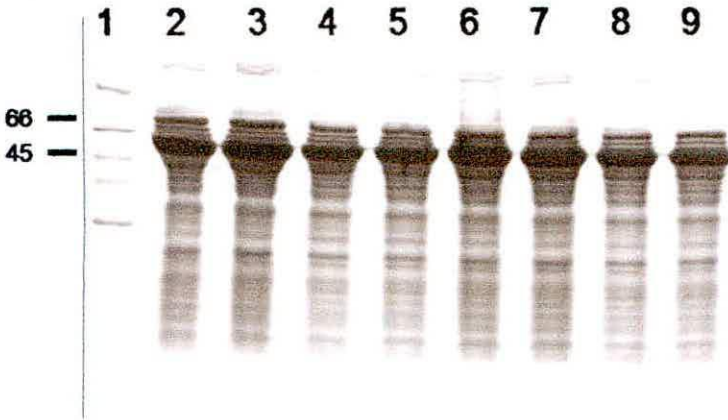
**Figura 9.27 Perfil de expresión de cecropina y retrocecropina (ER2566).** Electroforesis 12% Carril 1: Marcador de peso molecular (Bio-Rad) (kDa), CECdir (t: 16 hrs con IPTG 0.3 mM (carril 2), t: 16 hrs sin IPTG (carril 3)), CECret (t: 16 hrs con IPTG 0.3 mM (carril4), t: 16 hrs sin IPTG(carril 5)), pTYB11 sin fragmento (t: 16 hrs con IPTG 0.3 mM (carril 6), t: 16 hrs sin IPTG(carril 7)), ER2566 sin pTYB11 (t: 16 hrs con IPTG 0.3 mM (carril 8), t: 16 hrs sin IPTG( carril 9)), CECdir-CECret (t: 16 hrs con IPTG 0.3 mM(carril 10)).

Se obtuvo también una expresión exitosa de los dobletes CECdir-CECret y CECret-CECdir del tamaño esperado 63,4 kDa (figura 9.28).



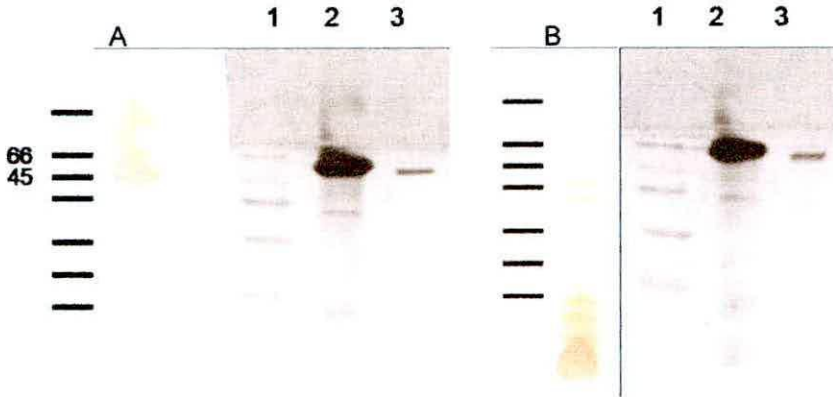
**Figura 9.28 Perfil de expresión de dobletes de cecropina (ER2566).** Electroforesis 12% Carril 1: Marcador de peso molecular (Bio-Rad) (kDa), CECdir-CECret (t: 16 hrs con IPTG 0.3 mM (carril 2), t: 16 hrs sin IPTG(carril 3)), CECret-CECdir (t: 16 hrs con IPTG 0.3 mM (carril 4), t: 16 hrs sin IPTG( carril 5)), pTYB11 sin fragmento (t: 16 hrs con IPTG 0.3 mM (carril 6), t: 16 hrs sin IPTG( carril 7)), ER2566 sin pTYB11 (t: 16 hrs con IPTG 0.3 mM (carril 8), t: 16 hrs sin IPTG(carril 9)), CEC (t: 16 hrs con IPTG 0.3 mM(carril 10)).

En cuanto a su extracción con lisozima se recuperó las proteínas de fusión en la fracción soluble al bajar la temperatura de expresión a 22°C (figura 9.29).



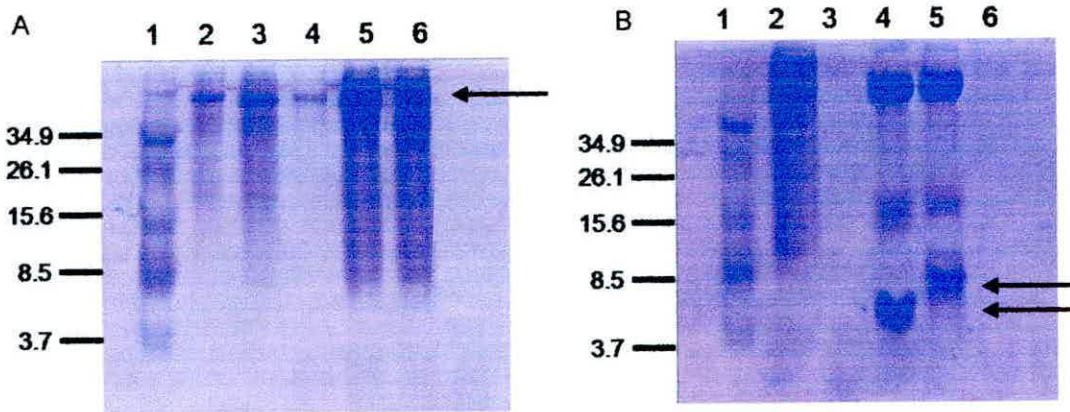
**Figura 9.29. Purificación y recuperación de péptidos de extracto celular.** Sobrenadante de lisado de proteínas extraídas con lisozima desde cultivos de ER2566 con pTYB11/ CEC<sub>dir</sub> y CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> inducidas con IPTG, resuelta a través de electroforesis Tris-tricina / Urea (18%). Carril 1: Marcador de peso molecular (Bio-Rad) (kDa), Carril 2-5: CEC<sub>dir</sub>, Carril 6-9: CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub>

Se confirmó que la proteína expresada correspondía a la proteína de fusión con inteína mediante un western blot, usando un anticuerpo específico contra el dominio de unión a quitina unido a la inteína (figura 9.30A), mientras que las restantes proteínas propias de *E. coli* reaccionaron contra un anticuerpo específico contra *E. coli* BL21 (figura 9.30B).



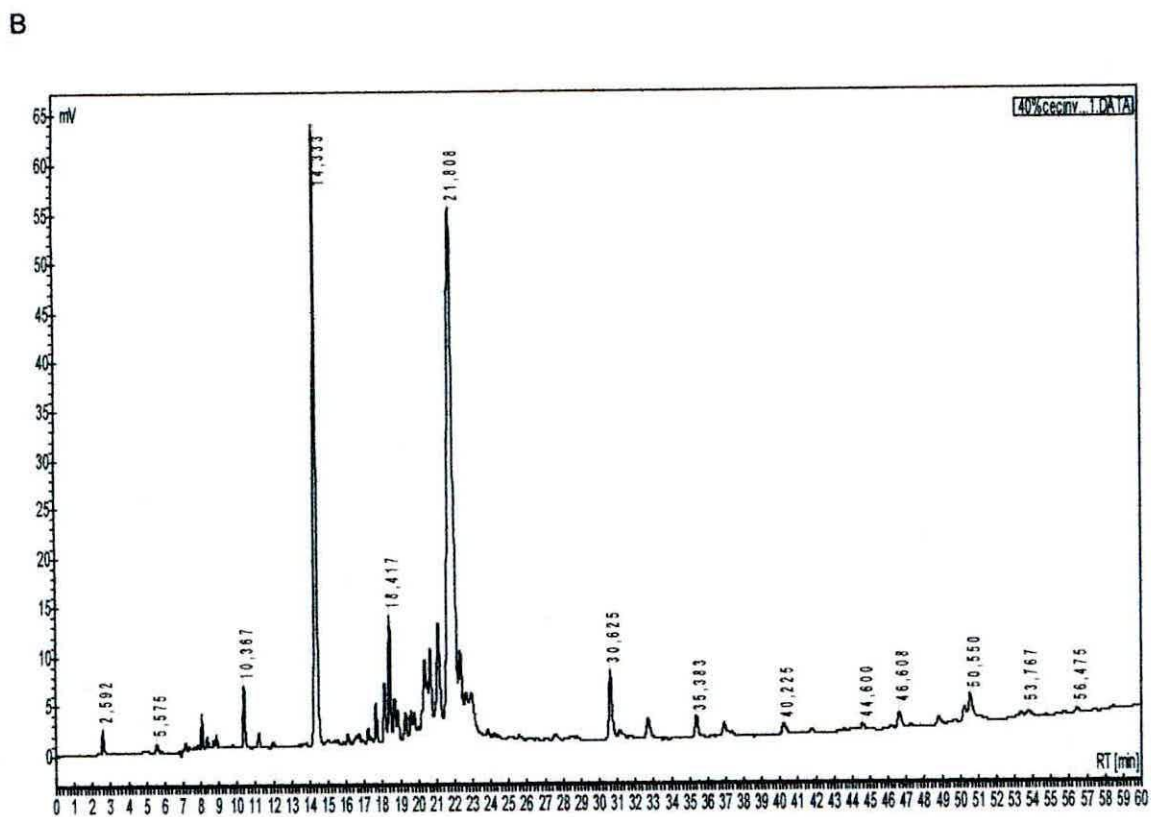
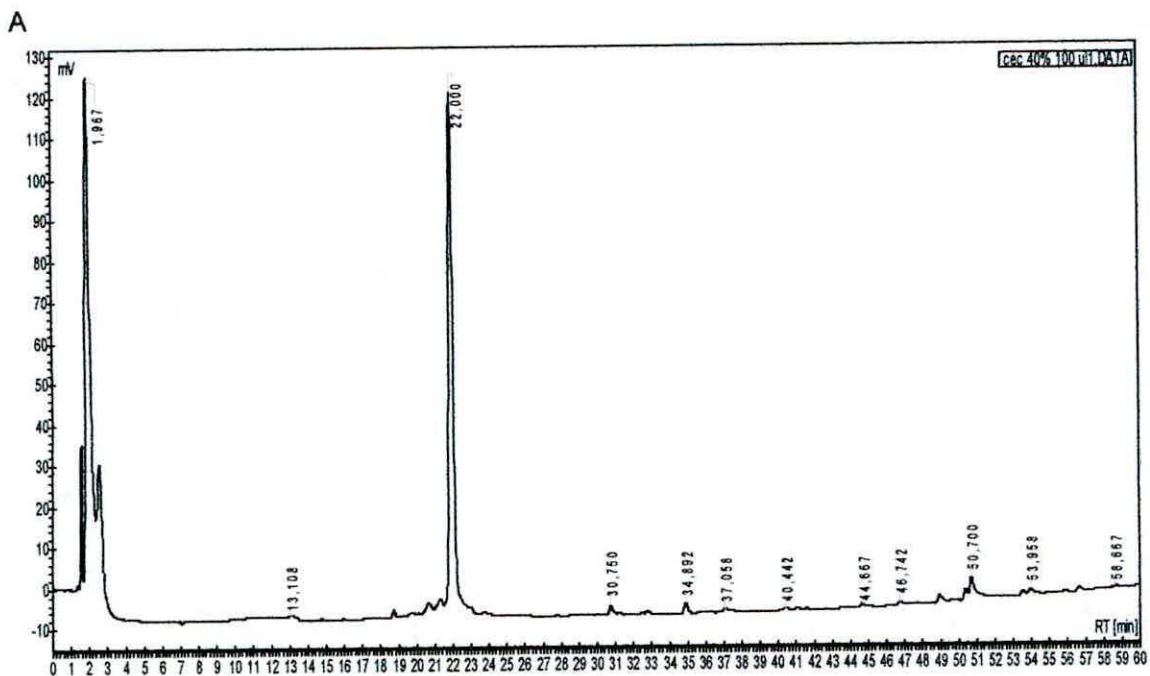
**Figura 9.30 Western blot de proteína de fusión.** (A) Inmunoblotting de proteína de fusión (CEC<sub>dir</sub>) con anticuerpo anti-CBD, (B) inmunoblotting de restantes proteínas de *E. coli* con anticuerpo anti-BL21. Carril 1: Marcador de peso molecular (Bio-Rad amplio rango), carril 2: resina de quitina con proteína de fusión antes de clivaje, carril 3: resina de quitina post DTT. Membrana fue teñida con diaminobenzidina.

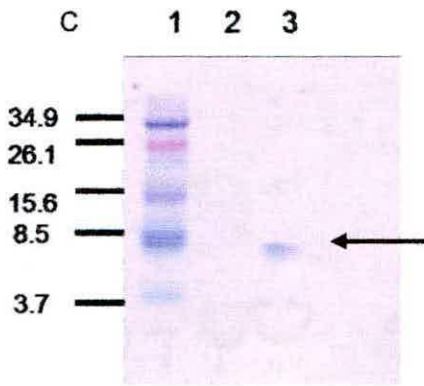
La fracción soluble de CEC<sub>dir</sub> y CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> fue cargada en columnas de quitina donde se indujo el clivaje con DTT por 40 hrs a 18°C, recuperándose los péptidos libre de su proteína de fusión (figura 9.31B, carril: 4-5). En el carril 4 y 5 se observa CEC<sub>dir</sub> (4,2 KDa) y CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> (8,4 KDa), respectivamente en la parte inferior del gel. Se puede observar como permanece unida la inteína a la columna de quitina en la parte superior del gel (carril: 4-5).



**Figura 9.31 Purificación de monómero y doblete de cecropina por columna de quitina.** (A) Carril 1: Marcador de peso molecular 34.9, 26.1, 15.6, 8.5 y 3.7 kDa (Bio-Rad), Carril 2: Pellet celular CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub>, Carril 3: Pellet celular CEC<sub>dir</sub>, Carril 4: sobrenadante CEC<sub>dir</sub>, Carril 5: sobrenadante CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub>, Carril 6: 1<sup>er</sup> lavado CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub>, Carril 7: 5<sup>o</sup> Lavado CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub>. (B) Carril 1: Marcador de peso molecular (Bio-Rad), Carril 2: 1<sup>er</sup> lavado CEC<sub>dir</sub>, Carril 3: 5<sup>o</sup> lavado CEC<sub>dir</sub>, Carril 4: clivaje de CEC<sub>dir</sub> en resina, Carril 5: clivaje de CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> en resina, Carril 6: lavado con DTT CEC<sub>dir</sub>, Carril 7: lavado con DTT CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub>.

Luego se hizo eluir los péptidos libres de inteína, y se desaltearon y se eliminó el DTT que podía afectar la actividad del péptido en columnas Sep-Pak recuperándose las proteínas CEC<sub>dir</sub> y CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> en la fracción del 40% que fue utilizada en RP-HPLC. En la RP-HPLC se obtuvo un peak al tiempo de retención 22.0 min para CEC<sub>dir</sub> (figura 9.32A) y dos peaks con tiempos de retención 14.3 y 21.8 para CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> (figura 9.32B), que se confirmó mediante electroforesis que fuera el mismo péptido (figura 9.32C).





**Figura 9.32 Purificación de monómero y doblete de cecropina por RP-HPLC.** (A) CECdir: Perfil de elusión de RP-HPLC de la fracción del 40% ACN de post Sep-Pak C-18 con un gradiente lineal de 5-60% ACN. (B) CECdir-CECret: Perfil de elusión de RP-HPLC de la fracción del 40% ACN de post Sep-Pak C-18 con un gradiente lineal de 5-60% ACN. (C) Perfil de proteínas resuelto a través de gel de electroforesis Tris-tricina/ Urea (18%). Carril 1: Marcador de peso molecular (Bio-Rad) (kDa), Carril 2: Eluido del peak del cromatograma con un tiempo de retención de 14,33 min, Carril 3: Eluido del peak del cromatograma con un tiempo de retención de 21,81 min que corresponde al doblete CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub>.

El péptido CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> purificado mediante RP-HPLC fue utilizado para ensayos antimicrobianos contra bacterias gram negativas, mostrando una alta actividad del orden del micromolar (Tabla 9.3).

**Tabla 8.3** Perfil antimicrobiano de fracción post-HPLC de CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub> aislado de ER2566 mediante sistema inteina.

Bacterias gram negativas	MIC (μM)
	CEC <sub>dir</sub> -CEC <sub>ret</sub>
<i>V. ordalii</i>	1,08
<i>V. alginolyticus</i>	1,08
<i>E.coli</i>	1,08

MIC esta dado por valores IC<sub>50</sub> (μM).

## 10. DISCUSIÓN

Este trabajo muestra el nuevo diseño de construcciones genéticas involucrando dobletes de la secuencia codificante de cecropina A de *Drosophila melanogaster*. La estrategia involucró la inversión de la secuencia codificante de aminoácidos comparado con la original, con el propósito de aumentar su potencial interacción con la membrana de bacterias patógenas basado en una interacción sinérgica mostrado por formas diméricas/oligoméricas de un AMP (Dempsey et al., 2003). Este es el primer reporte de generación de dobletes de AMPs sin puentes disulfuro uniendo los monómeros (Dempsey et al., 2003; Hristova et al., 2001) obtenido por biosíntesis de células y no por síntesis química (Merrifield et al., 1995). Estos constructos también se diferencian de dobletes clásicos contruidos por repeticiones en tandem obtenido de un sistema transcripción-traducción libre de células, que no mostró actividad (Martemyanov et al., 1997). El diseño y construcción de los nuevo dobletes no fue tarea fácil dado que la simple inversión de la secuencia codificante de la cecropina no da la inversión de la secuencia aminoacídica debido a que el código genético es degenerado. Por ello la necesidad de generar un gen de retrocecropina. En cuanto al mecanismo propuesto de rastrear los péptidos antimicrobianos mediante una cepa "porosa" (Miller et al., 1998) que liberara el contenido periplasmático al medio usando la secuencia señal periplasmática pelB, no fue posible para cecropina dado que no se escindió correctamente. Esto se puede deber a que el péptido señal es necesario, pero no suficiente para exportación al periplasma mediante sistema de translocación de membrana de *E.coli* (Wickner et al., 1991). No todas las proteínas son buenos candidatos para localización periplasmática, incluso puede ser tóxico para ellos (Snyder y Silhavy, 1995). La expresión de genes foráneos en *E.coli* generalmente lleva a la bacteria a empaquetar y acumular los péptidos en una forma densa y denaturada en la forma de agregados insolubles llamados cuerpos de inclusión (Tsumoto et al., 2003). En la mayoría de los casos la formación de cuerpos de inclusión es consecuencia de niveles de altas tasas de expresión o es dependiente de la naturaleza de la proteína, como peso molecular o hidrofobicidad (Lilie et al., 1998; Idicula-Thomas y Balaji, 2005; Ventura, 2005). Proteínas que contienen regiones fuertemente hidrofóbicas o altamente cargadas son más probables de formar cuerpos de inclusión. Ambas son características presentes en CECdirCECret que fue esencialmente dirigido a los cuerpos de inclusión. Dado que los niveles de expresión basal antes de la inducción pueden afectar el destino de los péptidos se probó alternativas. Bajos niveles de expresión basal en el sistema pET pueden ser

mantenidos al suplementar glucosa en el medio (Grossman et al., 1998; Novy y Morris, 2001) al bajar los niveles de AMPc y manteniendo la proteína activadora por catabolito (CAP) inactivada. Sin embargo esta represión catabólica mediante adición de glucosa hasta la fase estacionaria no afectó mayormente el destino del péptido (datos no mostrados). Además la carga neta de aminoácidos N-terminales de la proteína madura pueden inhibir la translocación (Kajava et al., 2000). Esto es una característica de la cecropina, con sus múltiples residuos de aminoácidos con carga positiva en este extremo lo que podría interferir su traslocación. Esto no cierra la posibilidad de usar esta idea, que encierra un potencial muy grande para agilizar el proceso de selección de AMPs que normalmente es lento, con otros péptidos o la utilización de otro péptido señal. El sistema de expresión seleccionado en células BL21 con pET27 resultó óptimo para obtener la expresión del doblete de cecropina CECdirCECret, siendo uno de los pocos casos en que un péptido activo es obtenido en bacterias sin el uso de proteínas de fusión o asociados a péptido señal (Piers et al., 1993; Skosyrev et al., 2003). El rendimiento en la recuperación del péptido fue del orden de 20 mg/lit desde cuerpos de inclusión, y de 340 µg/lit en la fracción soluble, más que aceptable y más aún sin péptido de fusión. Esto comparado con los niveles obtenidos en otros sistemas para obtener cecropina como *Bombyx mori* (Yamada et al., 1990) que mostró un rendimiento de 20 µg en 450 ml del medio de cultivo, *Saccharomyces cerevisiae* (Aly et al., 1999) con 80 µg en 1 lit de suspensión de levadura, *Pichia pastoris* (Jin et al., 2006) con 12 mg en 1 lit de suspensión de levadura, así como *E.coli* (Xu et al., 2007) con recuperación 11,2 mg en 1 lit, pero utilizando proteína de fusión. La extracción de la fuente natural, permite obtener 70 µg desde 150 ml de hemolinfa de *Sarcophaga peregrina* (Okada et al., 1983). El doblete eluyó alrededor del 47,5% ACN en concordancia con otros péptidos similares a cecropina (Kim et al., 2004). La caracterización de este péptido en geles de poliacrilamida confirmó su tamaño esperado. Esto fue apoyado por los datos obtenidos por HPLC donde se obtuvo un cromatograma con un peak característico que mediante un espectro MALDI-TOF se determinó un peso molecular prácticamente idéntico al teórico sin la metionina de inicio, mostrando que el péptido se encontraba completo. Modificaciones del extremo amino terminal de las proteínas donde se elimina la metionina inicial se puede observar en procariontes (Sherman et al., 1985), lo que parece indicar la acción de la metionina aminopeptidasa (Solbiati et al., 1999; Ben-Bassat et al., 1987). La fragmentación por espectrometría de masa con trampa iónica del peak de 2040 permitió saber sin ninguna duda que la molécula funcional recuperada corresponde a la genéticamente diseñado.

Trabajos posteriores realizados por el laboratorio de genética molecular e inmunología, mediante dicroísmo circular de este péptido doble mostró que la conformación  $\alpha$ -hélice del monómero cecropina se mantiene, elemento clave en la actividad antimicrobiana (Fu et al., 2004; Silvestro y Axelsen, 2000; Dathe y Wieprecht, 1999). La estabilidad mayor de este doblete comparada con las formas monoméricas que no se expresaron, sin pelB, se puede deber a que la estabilidad de péptidos pequeños producidos en *E.coli* ha sido aumentada si estos péptidos son unidos en tandem como un polímero grande de unidades repetidas (Shen, 1984). Además se puede deber al hecho de que en CECdirCECret las colas hidrofóbicas se encuentran dirigidas hacia el interior en este doblete y por tanto no se encuentra disponible a diferencia de los monómeros y el otro doblete CECretCECdir donde las colas están dirigidas hacia fuera. Un péptido así es potencialmente tóxico para el hospedero debido a que regiones hidrofóbicas no plegadas y libres tienen la tendencia de unirse a otras proteínas del citosol, así como adherirse a las membranas celulares (Laage y Langosch, 2001; Benita et al., 2006). Esto puede provocar que el hospedero no exprese o degrade este péptido, como puede ser el caso de CECretCECdir. Por otro lado el doblete CECdirCECret mostró un amplio rango de actividad antimicrobiana contra bacterias gram negativas, gram positivas y hongos presentando una potente actividad con muy bajo MIC. Esto es especialmente importante en el caso de la bacteria *Vibrio ordalii* y el hongo *Saprolegnia sp*, que son patógenos que afectan a la acuicultura chilena y donde su inhibición fue prácticamente completa a bajas concentraciones del péptido. Esto demuestra que el doblete no sólo aumento la potencia antibacteriana (Zaslhoff 2002; Boman 1998), sino que también aumenta el espectro de acción a nuevos patógenos como es el caso del hongo *Saprolegnia sp*, en comparación a la cecropina parental (DeLucca et al., 1997). En cuanto a la actividad antimicrobiana aumentada que presentó el doblete de cecropina comparado con la cecropina esta es una propiedad de la nueva molécula, dado que la retrocecropina obtenida por síntesis química no mostró actividad por si misma y la cecropina obtenida por síntesis química presentó una actividad menor que el doblete. El aumento de la actividad por el doblete de cecropina podría tal vez apoyar un proceso de oligomerización o formación de agregado de este péptido en la membrana bacteriana de una manera similar a la obtenida por magainina (Zemel et al., 2005; Dempsey et al., 2003). El aumento de de las propiedades catiónicas de los péptidos es un elemento que se ha visto puede ayudar a potenciar la actividad antimicrobiana (Wang et al., 1998; Fink et al., 1989). Este es el caso del doblete diseñado que duplica las cargas positivas disponibles (carga neta +12) en una forma

versátil, manteniendo una estructura helicoidal de dos cabezas mayores, de acuerdo a datos disponibles (Tenaza et al., 1999; Dempsey et al., 2003). El doblete CECdirCECret fue diseñado para permitir la acción sinérgica de los dos extremos amino, en donde los extremos carboxi, unidos internamente por dos glicinas cumplen la función de puente (Xiao et al., 2006) entre los monómeros. Un estudio de péptidos antimicrobianos helicoidales revelan que la glicina es frecuentemente encontrada cerca del centro y que actúa como puente para aumentar la flexibilidad en muchas familias proteicas (Tossi et al., 2000). La presencia de una inserción de este tipo de puente en la hélice, es en muchos casos deseable, atenuando la toxicidad de péptidos hacia el hospedero, mientras que mantiene la potencia antimicrobiana comparable (Tossi et al., 2000; Dathe y Wieprecht, 1999). Esto podría explicar la baja citotoxicidad presentada por el doblete, como comprobado sobre la línea celular de peces CHSE-214, dado que esta línea celular es altamente sensible a agentes exógenos y por ende, constituye un buen modelo para éste propósito (Lannan et al., 1984). Esto permite así asegurar la naturaleza inocua de los péptidos para el huésped, elemento crucial para su potencial aplicación terapéutica. En cuanto a los sistemas alternativos propuestos para optimizar los niveles de expresión, la elección del sistema de expresión mediante el fago lambda CE6 se debió al éxito mostrado en expresar proteínas extremadamente tóxicas gracias a una prácticamente nula expresión basal (Doherty et al., 1993). Sin embargo la inducción con el fago lambda CE6 no resultó del todo, tal vez por el hecho que este mecanismo requiere un control muy preciso de la multiplicidad de infección (MOI) por célula, donde este si es menor no se induce la expresión y si es mayor se inhibe la síntesis proteica (Studier et al., 1990; Miao et al., 1993). El otro sistema propuesto mediado por sistema inteina, los análogos proteicos de los intrones, permitió la expresión y recuperación de péptidos activos, sin la necesidad del clivaje químico o enzimático para liberar el péptido de su proteína de fusión (Morasutti et al., 2005), que son tóxicos o costosos. La razón para seleccionar el vector pTYB11 (fusión de la inteina por el extremo N-terminal del péptido) en desmedro del vector pTYB1 (fusión de la inteina por el extremo C-terminal del péptido) se debió a la intención de proteger la región más propensa a la degradación de la cecropina (región de aminoácidos básicos cargados positivamente, que en conjunto con los residuos de triptófano y glicina del extremo son responsable en gran parte de la actividad antimicrobiana de la cecropina (Skosyrev et al., 2003; Okemoto et al., 2002). De esta manera se logró proteger el péptido en forma similar a como ocurre con el prepro péptido de la cecropina *in vivo* (Zasloff, 2002). Esta estrategia permitió obtener la expresión de

ambos monómeros y dobles, demostrando que protege a los péptidos con la fusión de inteina cumpliendo el papel que tienen las secuencias prepro que utilizan los AMPs. Para lograr la expresión de los péptidos en la fracción soluble fue necesario bajar la temperatura de inducción desde 37°C hasta 22°C (datos no mostrados). El crecimiento a 37°C puede causar la acumulación de algunas proteínas en cuerpos de inclusión, mientras que la disminución de la temperatura puede llevarlos a su forma soluble y activa (Xu et al., 2005; Schein y Noteborn, 1989). Luego de la purificación en las columnas de quitina se demostró que el péptido de fusión inteina se autoescindió en forma exitosa del péptido CECdirCECret. El rendimiento en la recuperación post Sep-pak y HPLC del péptido CECdirCECret fue del orden de 2,2 mg/lt desde la fracción soluble. Esto comparado con otros estudios empleando el sistema inteina para otros péptidos antimicrobianos como la bacteriocina piscicolina 126 de 1,1 mg/lt (Ingham et al., 2005) y el péptido antimicrobiano SMAP-29 fue de 200 ug/lt (Morassutti et al., 2005). El análisis en geles de poliacrilamida confirmó su tamaño esperado y luego de HPLC se mostró su pureza y la recuperación de actividad antimicrobiana del orden micromolar.

## 11. CONCLUSIONES

En resumen los resultados de este trabajo apoyan la viabilidad de producir los AMPs sin proteínas de fusión o péptidos señal. Además esta forma doble con novedosa conformación de la cecropina permitió aumentar la expresión, estabilidad y actividad comparada con su forma monomérica, diseñando así un nuevo modelo para mejorar a otros AMPs. Se expone además una nueva alternativa para estabilizar la expresión de péptidos que no se pueden expresar de otra forma mediante el uso de inteínas, así como la forma de obtener estos en forma soluble y en forma libre de proteína de fusión gracias a su actividad autocatalítica. Trabajos posteriores realizados por el laboratorio de Genética Molecular e Inmunología, en cultivos de salmónidos ha permitido demostrar su efectividad y exitoso control *in vivo* contra el hongo *Saprolegnia sp*, un importante patógeno de la acuicultura nacional a concentraciones muy bajas del péptido, lo que permite proyectar un uso de este péptido. El diseño y construcción de dobletes de las secuencias codificadoras de cecropina y su forma invertida, permitieron así generar recombinantes que expresados en sistemas heterólogos mostraron mayor actividad o espectro de acción que los péptidos parentales sobre agentes patógenos que afectan la acuicultura.

Los atributos de los péptidos hacen que este producto sea más atractivo que los antibióticos y vacunas. Es un producto utilizado preventivamente, es de origen natural y se diferencia de los antibióticos químicos clásicos. Por la misma razón no sería residual en la carne procesada de los ejemplares que los consumen, correspondiendo a un apropiado producto que permitiría el cultivo 100% "orgánico". Su degradación natural contrasta beneficiosamente con la aditividad peligrosa que presentan los antibióticos al ser liberados en el medio, siendo amigable con el medio ambiente. No presentan citotoxicidad contra el huésped dado su carácter eucariótico y por lo mismo no presentan problemas para el consumo, facilitando su comercialización. Presentan una rápida acción a diferencia de las vacunas, que requieren tiempos mucho más largos, aún más, tratándose de animales de sangre fría, no generarían resistencia en los patógenos como los antibióticos clásicos y serían aplicables especialmente en estadios tempranos de vida de organismos marinos cultivables cuando son más susceptibles al ataque de agentes patógenos. Esta propuesta entregaría así una respuesta a la necesidad de erradicar microorganismos patógenos en cultivos confinados de la acuicultura nacional y adelantarse a la amenaza de la aparición local de nuevas enfermedades en la acuicultura.

## **12. RECOMENDACIONES**

Trabajos posteriores buscaran optimizar el funcionamiento para la expresión de la variante de CECretCECdir cuya actividad no fue probada. Así mismo el sistema inteina puede proyectarse para la expresión de otros péptidos antimicrobianos que no pueden ser expresados mediante otros sistemas dada su toxicidad para el hospedero. La estrategia de diseño de dobles puede ser explorada para la optimización o diseño de péptidos nuevos dado el éxito del doblete de cecropina. El sistema "leaky" de E609L debiera ser explorado probando otros péptido señal o péptido antimicrobiano para ver si se puede poner a punto como sistema de rastreo. La actividad de CECdirCECret puede aún ser mejorada, ya que la producción recombinante de *E.coli* no permite el procesamiento post-traducciona del extremo C-terminal, al no poseer la glicina oxidasa (Skosyrev et al, 2003). Las cecropinas naturales de insecto sufren normalmente la amidación C-terminal del residuo de glicina, que se ha visto tiene importancia en la actividad antimicrobiana contra bacterias gram positivas y negativas (Vizioli et al, 2000). La modificación post-traducciona es considerada necesaria para la actividad completa de la molécula (Hara et al., 1994; Li et al., 1988). Una alternativa posible es el uso del sistema inteina que puede permitir la amidación de los péptidos en su procesamiento.

### **13. NOMENCLATURA**

ACN: Acetonitrilo

AMP: Péptidos antimicrobianos

CECdir: Cecropina directa o parental

CECret: Retro cecropina

drAMP: Péptidos antimicrobianos dobles

DTT: 1,4-Ditiotreitol

IPTG: Isopropil- $\beta$ -D-tio-galactopiranosido

LB: Luria-Bertani

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RP-HPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa

## **14. REFERENCIAS**

- Aguirre, G; Ascencio, F. (2000). Infectious disease in shrimp species with aquaculture potential. *Recent Res Dev Microbiol*, 4: 333-348.
- Aly R, Granot D, Mahler-Slasky Y, Halpern N, Nir D, Galun E. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* cells harboring the gene encoding sarcotoxin IA secrete a peptide that is toxic to plant pathogenic bacteria. *Protein Expr Purif*, Jun;16(1): 120–124.
- Andreu, D; Merrifield, RB; Steiner, H; Boman, HG. (1983). Solid-phase synthesis of cecropin A and related peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*, Nov;80(21): 6475-6479.
- Andreu D, Ubach J, Boman A, Wählin B, Wade D, Merrifield RB, Boman HG. (1992). Shortened cecropin A-melittin hybrids. Significant size reduction retains potent antibiotic activity. *FEBS Lett*. Jan ;296(2):190-194
- Aquanoticias Internacional. (2003). Alcance de Piscirickettsiosis en industria salmonicultura, 79: 18-19.
- Ausubel, FM; Brent, R; Kingston, RE; Moore, DD; Seidman, JG; Smith, JA; Struhl, K. (1999). Short protocols in molecular biology. John Wiley & Sons.
- Batista, CV; Scaloni, A; Rigden, DJ; Silva, LR; Rodrigues Romero, A; Dukor, R; Sebben, A; Talamo, F; Bloch, C. (2001). A novel heterodimeric antimicrobial peptide from the tree-frog *Phyllomedusa distincta*. *FEBS Lett*, Apr;494(1-2): 85-89.
- Ben-Bassat A, Bauer K, Chang SY, Myambo K, Boosman A, Chang S. (1987). Processing of the initiation methionine from proteins: properties of the *Escherichia coli* methionine aminopeptidase and its gene structure. *J Bacteriol*. Feb;169(2):751-757.
- Benita Y, Wise MJ, Lok MC, Humphery-Smith I, Oosting RS. (2006). Analysis of high throughput protein expression in *Escherichia coli*. *Mol Cell Proteomics*. 2006 Sep;5(9):1567-1580.

- Blattner, FR; Plunkett, G 3rd; Bloch, CA; Perna, NT; Burland, V; Riley, M; Collado-Vides, J; Glasner, JD; Rode, CK; Mayhew, GF; Gregor, J; Davis, NW; Kirkpatrick, HA; Goeden, MA; Rose, DJ; Mau, B; Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277: 1453-1474.
- Boman HC, Boman IA, Andreu D, Li ZQ, Merrifield RB, Schlenstedt G, Zimmermann R. Chemical synthesis and enzymic processing of precursor forms of cecropins A and B. (1989) *J Biol Chem*, Apr;264(10): 5852-5860.
- Boman, HG. (1991). Antibacterial Peptides: Key Components Needed in Immunity. *Cell* 65: 205-207.
- Boman, HG. (1998). Gene-encoded peptide antibiotics and the concept of innate immunity: an update review. *Scand J Immunol*, 48: 15-25.
- Bondad-Reantaso MG, Subasinghe RP, Arthur JR, Ogawa K, Chinabut S, Adlard R, Tan Z, Shariff M. (2005). Disease and health management in Asian aquaculture. *Vet Parasitol*, Sep;132(3-4):249-272.
- Bhugaloo-Vial, P; Douliez, JP; Moll, D; Dousset, X; Boyaval, P; Marion, D. (1999). Delineation of key amino acid side chains and peptide domains for antimicrobial properties of divercin V41, a pediocin-like bacteriocin secreted by *Carnobacterium divergens* V41. *Appl Environ Microbiol*, 65: 2895-2900.
- Cabello FC. (2004). Antibiotics and aquaculture in Chile: implications for human and animal health. *Rev Med Chil*, Aug;132(8):1001-1006.
- Carvajal, P. (2000). Industria creciente, vacunas para la salmonicultura. *Salmonoticias*, 83:11-15.
- Chen Y, Guarnieri MT, Vasil AI, Vasil ML, Mant CT, Hodges RS. (2007). Role of peptide hydrophobicity in the mechanism of action of alpha-helical antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother*. Apr;51(4):1398-1406.

- Chen Y, Mant CT, Farmer SW, Hancock RE, Vasil ML, Hodges RS. (2005). Rational design of alpha-helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index. *J Biol Chem*. Apr 1;280(13):12316-12329.
- Chertov, O. (2000). LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med*, 192: 1069-1074.
- Chong S, Mersha FB, Comb DG, Scott ME, Landry D, Vence LM, Perler FB, Benner J, Kucera RB, Hirvonen CA, Pelletier JJ, Paulus H, Xu MQ. (1997). Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element. *Gene*, Jun;192(2): 271-281.
- Chong S, Shao Y, Paulus H, Benner J, Perler FB, Xu MQ. (1996). Protein splicing involving the *Saccharomyces cerevisiae* VMA intein. The steps in the splicing pathway, side reactions leading to protein cleavage, and establishment of an in vitro splicing system. *J Biol Chem*, Sep;271(36): 22159-22168.
- Clare, JJ; Rayment, FB; Ballantine, SP; Sreekrishna, K y Romanos, MA. (1991). High-level Expression of Tetanus Toxin Fragment c in *Pichia pastoris* Strains Containing Multiple Tandem Integrations of the Gene. *Bio/Technology*, 9: 455-460.
- Cole, AM; Weis, P; Diamond, G. (1997). Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *J Biol Chem*, 272: 12008-12013.
- Cudic, M; Otvos, L Jr. (2002). Intracellular Targets of antibacterial Peptides. *Curr Drug Targets*, Apr;3(2): 101-106.
- Cudic, M; Condie, BA; Weiner, DJ; Lysenko, ES; Xiang, ZQ; Insug, O; Bulet, P; Otvos, L Jr. (2002). Development of novel antibacterial peptides that kill resistant isolates. *Peptides*, 23: 2071-2083.

- Dathe M, Wieprecht T. (1999). Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochim Biophys Acta*, Dec;1462(1-2):71-87.
- DeLucca AJ, Bland JM, Jacks TJ, Grimm C, Cleveland TE, Walsh TJ. (1997). Fungicidal activity of cecropin A. *Antimicrob Agents Chemother*. Feb;41(2):481-483.
- Dempsey, CE; Ueno, S; Avison, MB. (2003). Enhanced membrane permeabilization and antibacterial activity of a disulfide-dimerized magainin analogue. *Biochemistry*, Jan;42(2): 402-409.
- Destoumieux, D; Bulet, P; Loewi, D; Van Dorsselaeri, A; Rodriguez, J; Bachère, E. (1997). Penaeidins, a New Family of Antimicrobial Peptides Isolated from the Shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *J Biol Chem*, 272: 28398-28406.
- Destoumieux, D; Muñoz, M; Bulet, P ; Bachère, E. (2000). Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). *Cell Mol Life Sci*, 57: 1260-1271.
- Dixon, BA. (1994). Antibiotic resistance in bacterial fish pathogens. *Journal of the World Aquaculture Society*, 25: 136-139.
- Doherty AJ, Connolly BA, Worrall AF. (1993). Overproduction of the toxic protein, bovine pancreatic DNaseI, in *Escherichia coli* using a tightly controlled T7-promoter-based vector. *Gene*. Dec;136(1-2): 337-340.
- Dubendorff JW, Studier FW. (1991). Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J Mol Biol*, May;219(1): 45-59.
- Durell, SR; Raghunathan, G; Guy, HR. (1992). Modeling the ion channel structure of cecropin. *Biophys J*, 63: 1623-1631.

- Evelyn, TP. (1996). Infection and diseases. The Fish Immune System. Academic Press, San Diego 339-359.
- FAO (2007). State of World Aquaculture 2006.
- Fink J, Merrifield RB, Boman A, Boman HG. The chemical synthesis of cecropin D and an analog with enhanced antibacterial activity. (1989). *J Biol Chem*, Apr;264(11):6260-6267.
- Froy, O; Gurevitz, M. (2003). Arthropod and mollusk defensins - evolution by exon-shuffling. *Trends Genet*, 19: 684-687.
- Fryer, JL; Lannan, CN; Garcés, LH; Larenas, JJ; Smith, PA. (1990). Isolation of a rickettsiales-like organism from diseased coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Chile. *Fish Pathol*, 25: 107-114.
- Fryer, JL; Lannan, CN. (1996). Rickettsial infections of fish. *Annu Rev Fish Dis*, 6: 3-13.
- Fryer, JL; Mael, MJ. (1997). The rickettsia: an emerging group of pathogens in fish. *Emerg Infect. Dis*, 3: 137-144.
- Fu H, Björstad A, Dahlgren C, Bylund J. (2004). A bactericidal cecropin-A peptide with a stabilized alpha-helical structure possess an increased killing capacity but no proinflammatory activity. *Inflammation*. 2004 Dec;28(6):337-343.
- Ganassin, RC; Bols, NC. (1998). Development of a monocyte/macrophage-like cell line, RTS11, from rainbow trout spleen. *Fish Shellfish Immunol*, 8: 457-476.
- Giangaspero, A; Sandri, L; Tossi, A. (2001). Amphipathic  $\alpha$  helical antimicrobial peptides: A systematic study of the effects of structural and physical properties on biological activity. *Eur J Biochem*, 268: 5589-5600.
- Gill, I; Vulfson, E. (1994). Enzymic catalysis in heterogeneous eutectic mixtures of substrates. *Trends Biotechnol*, Apr;12(4):118-122.

- Gornati R, Papis E, Rimoldi S, Terova G, Saroglia M, Bernardini G. (2004). Rearing density influences the expression of stress-related genes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Gene*, Oct;341:111-118.
- Grossman TH, Kawasaki ES, Punreddy SR, Osborne MS. (1998). Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene*, Mar;209(1-2): 95-103.
- Gudmundsson, GH; Lidholm, DA, Åsling, B; Gan, R; Boman, HG. (1991). The cecropin locus. Cloning and expression of a gene cluster encoding three antibacterial peptides in *Hyalophora cecropia*. *J Biol Chem*, 266: 11510-11517.
- Guzmán, F; Barberis, S; Illanes, A. (2007). Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *Electronic Journal of Biotechnology*, Apr;10(2) Available from: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol10/issue2/full/13/reprint.html> ISSN 0717-3458
- Hancock, RE. (1997). The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends Microbiol*, 5: 37-42.
- Hancock, RE; Chapple, DS. (1999). Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*, 43: 1317-1323.
- Hancock, RE; Scott, MG. (2000). The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 8856-8861.
- Hancock, RE. (2001). Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis*, 1: 156-164.
- Hancock, RE; Rozek, A. (2002). Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol Lett*, 206: 143-149.
- Hancock, RE, Brown KL, Mookherjee N. (2006). Host defence peptides from invertebrates -emerging antimicrobial strategies. *Immunobiology*. 211(4):315-322.

- Hannig, G; Makrides, SC. (1998). Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol*, 16: 54-60.
- Hao G, Shi YH, Han JH, Li QH, Tang YL, Le GW. (2008). Design and analysis of structure-activity relationship of novel antimicrobial peptides derived from the conserved sequence of cecropin. *J Pept Sci*. Mar;14(3): 290-298.
- Hara S, Taniai K, Kato Y, Yamakawa M. (1994). Isolation and  $\alpha$ -amidation of the non-amidated form of cecropin D from larvae of *Bombyx mori*. *Comp Biochem Physiol B*. 108(3): 303-308.
- Hicks RP, Bhonsle JB, Venugopal D, Koser BW, Magill AJ. (2007). De novo design of selective antibiotic peptides by incorporation of unnatural amino acids. *J Med Chem*. Jun;50(13):3026-3036.
- Holak, TA; Engström, Å; Kraulis, PJ; Lindeberg, G; Bennich, H; Jones, TA; Gronenborn, AM; Clore, GM. (1988). The solution conformation of the antimicrobial peptide cecropin A: a nuclear magnetic resonance and dynamical simulated annealing study. *Biochemistry*, 27: 7620-7629.
- Horne, MT. (1997). Technical Aspects of the Administration of Vaccines. *Fish Vaccinology*, 90: 79-89.
- Hornef, MW; Putsep, K; Karlsson, J; Refai, E; Andersson, M. (2004). Increased diversity of intestinal antimicrobial peptides by covalent dimer formation. *Nat Immunol*, Aug;5(8): 836-843.
- Hristova, K; Dempsey, CE; White, SH. (2001). Structure, location, and lipid perturbations of melittin at the membrane interface. *Biophys J*, Feb;80(2): 801-811.
- Huang, Y; Nordeen, RO; Di, M; Owens, LD; McBeath, JH. (1997). Expression of an engineered cecropin gene cassette in transgenic tobacco plants confers disease resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Phytopathology*, 87: 494-499.

- Idicula-Thomas S; Balaji PV. (2005) Understanding the relationship between the primary structure of proteins and its propensity to be soluble on overexpression in *Escherichia coli*. *Protein Sci*, Mar;14(3):582-592.
- IFOP (2007). Exportaciones de acuicultura chilena 2006.
- Ingham AB, Sproat KW, Tizard ML, Moore RJ. (2005). A versatile system for the expression of nonmodified bacteriocins in *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol*. 98(3):676-683.
- Invitrogen (2002). BL21 Star (DE3) One shot. Chemically Competent Cells. Versión D.
- Invitrogen (2003). Pichia Expression kit: A manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in *Pichia Pastoris*. Versión F.
- Iwai H, Nakajima Y, Natori S, Arata Y, Shimada I. (1993). Solution conformation of an antibacterial peptide, sarcotoxin IA, as determined by <sup>1</sup>H-NMR. *Eur J Biochem* Oct;217:639-44.
- Jia, X; Patrzykat, A; Devlin, RH; Ackerman, PA; Iwama, GK; Hancock, RE. (2000). Antimicrobial Peptides Protect Coho Salmon from *Vibrio anguillarum* Infections. *Appl Environ Microbiol*, 66: 1928-1932.
- Jin F, Xu X, Zhang W, Gu D. (2006). Expression and characterization of a housefly cecropin gene in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, Sep;49(1):39-46.
- Jonasson, P; Liljeqvist, S; Nygren, P; Ståhl, S. (2002). Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem*, 35: 91-105.
- Josefsson, S; Tatner, MF. (1993). Histogenesis of the lymphoid organs in seabream (*Sparus aurata*). *Fish Shellfish Immunol*, 3: 35-49.

- Juvadi P, Vunnam S, Merrifield EL, Boman HG, Merrifield RB. (1996). Hydrophobic effects on antibacterial and channel-forming properties of cecropin A-melittin hybrids. *J Pept Sci*. Jul-Aug;2(4):223-232.
- Juvadi P, Vunnam S, Yoo B, Merrifield RB. (1999). Structure-activity studies of normal and retro pig cecropin-melittin hybrids. *J Pept Res*. 1999 Mar;53(3):244-251.
- Kajava AV, Zolov SN, Kalinin AE, Nesmeyanova MA. (2000). The net charge of the first 18 residues of the mature sequence affects protein translocation across the cytoplasmic membrane of gram-negative bacteria. *J Bacteriol*, Apr;182(8): 2163-2169.
- Khoo, L; Robinette, D; Noga, EJ. (1999). Isolation of callinectin, an antibacterial peptide from blue crab, *Callinectes sapidus*, hemocytes. *Mar Biotechnol*, Jan;1: 41-51.
- Kim C, Lee J, Kim I, Seo S, Son S, Lee K, Lee I. (2004). Purification and cDNA cloning of a cecropin-like peptide from the great wax moth, *Galleria mellonella*. *Mol Cells*, Apr;17(2): 262-266.
- Kinkelin, P; Michel C; Ghittino, P. (1991). *Tratado de las enfermedades de los peces*. Ed. Acribia.
- Kragol, G; Lovas, S; Varadi, G; Condie, BA; Hoffmann, R; Otvos, L Jr. (2001). The antibacterial peptide pyrrocoricin inhibits the ATPase actions of Dnak and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry*, 40: 3016-3026.
- Kragol, G; Hoffmann, R; Chattergoon, MA; Lovas, S; Cudic, M; Bulet, P; Condie, BA; Rosengren, KJ; Montaner, LJ; Otvos, L Jr. (2002). Identification of crucial residues for the antibacterial activity of the proline-rich peptide, pyrrocoricin. *Eur J Biochem*, 269: 4226-4237.
- Kuliopulus, A. (1994). High-Yield Expression and Purification of Recombinant Peptides. *inNovations* 2, Nov: 1-4.

- Kylsten, P; Samakovlis, C; Hultmark, D. (1990). The cecropin locus in *Drosophila*; a compact gene cluster involved in the response to infection. *EMBO J*, 9: 217-224.
- Laage, R; Langosch, D. (2001). Strategies for prokaryotic expression of eukaryotic membrane proteins. *Traffic*. Feb;2(2):99-104.
- Laine, S, Salhi, S; Rossignol, JM. (2002). Overexpression and purification of the hepatitis B e antigen precursor. *J Virol Methods*, 103: 67-74.
- Landon C, Barbault F, Legrain M, Guenneugues M, Vovelle F. (2008). Rational design of peptides active against the gram positive bacteria *Staphylococcus aureus*. *Proteins*.
- Lannan, CN; Winton, JR; Fryer, JL. (1984). Fish Cell Lines: Establishment and characterization of nine cell lines from salmonids. *In Vitro*, 20: 671-676.
- Lehrer, RI; Rosenman, M; Harwig, SS; Jackson, R; Eisenhauer, P. (1991). Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J Immunol Methods*, 137: 167-173.
- Li ZQ, Merrifield RB, Boman IA, Boma HG. (1988). Effects on electrophoretic mobility and antibacterial spectrum of removal of two residues from synthetic sarcotoxin IA and addition of the same residues to cecropin B. *FEBS lett*. 231(2): 299-302.
- Lilie H, Schwarz, E, Rudolph R. (1998). Advances in refolding of proteins produced in *E.coli*. *Curr Opin Biotechnol*, Oct;9(5): 497-501.
- Liu S, Zhou L, Li J, Suresh A, Verma C, Foo YH, Yap EP, Tan DT, Beuerman RW. (2008). Linear Analogues of Human beta-Defensin 3: Concepts for Design of Antimicrobial Peptides with Reduced Cytotoxicity to Mammalian Cells. *ChemBiochem*.
- Lucentini, J. (2003). Antibiotics Arms Race Heats Up. *The Scientist*, 17: 29.
- Lüders, T; Birkemo, GA; Fimland, G; Nissen-Meyer, J; Ingolf, F. (2003). Strong synergy between a eucaryotic antimicrobial peptide and bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 69: 1797-1799.

- Marshall, SH; Arenas, G. (2003). Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electronic Journal of Biotechnology*, Dec;6(3) Available from: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol6/issue3/full/1/index.html> ISSN: 0717-3458
- Matsuzaki, K. (1999). Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim Biophys Acta*, 1462: 1-10.
- Mátyus E, Kandt C, Tieleman DP. (2007). Computer simulation of antimicrobial peptides. *Curr Med Chem*. 14(26):2789-98.
- Mercado, L; Schmitt, P; Marshall, S; Arenas, G. (2005). Gill tissues of the mussel *Mytilus edulis chilensis*: A new source for antimicrobial peptides. *Electronic Journal of Biotechnology*, Dec;8(3) Available from: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol8/issue3/full/2/index.html> ISSN 0717-3458
- Merrifield, RB; Juvvadi, P; Andreu, A; Ubach, J; Boman, A; Boman, HG. (1995). Retro and retroenantio analogs of cecropin-melittin hybrids. *Proc Natl Acad Sci USA*, Apr;92: 3449-3453.
- Merrifield EL, Mitchell SA, Ubach J, Boman HG, Andreu D, Merrifield RB. (1995). D-enantiomers of 15-residue cecropin A-melittin hybrids. *Int J Pept Protein Res*. Sep-Oct;46(3-4):214-220.
- Meyer FP. (1991). Aquaculture disease and health management. *J Anim Sci*, 69: 4201-4208.
- Miao F, Drake SK, Kompala DS. (1993). Characterization of gene expression in recombinant *Escherichia coli* cells infected with phage lambda. *Biotechnol Prog*, Mar-Apr;9(2): 153-159.

- Miller, KW; Schamber, R; Chen, Y; Ray, B. (1998). Production of active chimeric pediocin AcH in *Escherichia coli* in the absence of processing and secretion genes from the *Pediococcus* pap operon. *Appl Environ Microbiol*, 64: 14-20.
- Mitta, G; Hubert, F; Noël, T; Roch, P. (1999). Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Eur J Biochem*, 265: 71-78.
- Mitta, G; Vandenbulcke, F; Hubert, F; Salzet, M; Roch, P. (2000). Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. *J Biol Chem*, 275: 12954-12962.
- Morassutti C, De Amicis F, Bandiera A, Marchetti S. (2005). Expression of SMAP-29 cathelicidin-like peptide in bacterial cells by intein-mediated system. *Protein Expr Purif*. Feb;39(2): 160-168.
- Muñoz, M; Vandenbulcke, F; Gueguen, Y; Bachère, E. (2003). Expression of penaeidin antimicrobial peptides in early larval stages of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Dev Comp Immunol*, 27: 283-289.
- Nieto Lozano, JC; Meyer, JN; Sletten, K; Pelaz, C; Nes, IF. (1992). Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J Gen Microbiol*, 138: 1985-1990.
- Nilsson, B; Soellner, M; Raines, R. (2005). Chemical Synthesis of Proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct*, Jun;34: 91-118.
- Noga, EJ. (2001). <http://www.nps.ars.usda.gov/static/arsoibiotecws2001/contributions/Noga.htm>
- Novagen (2002). PET System Manual. 10<sup>a</sup> edición.
- Novy R, Morris B. (2001). Use of glucose to control basal expression in the pETSystem. *InNovations*, Nov;13: 8-10.

- Okada, M; Natori, S. (1983). Purification and characterization of an antibacterial protein from haemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh-fly) larvae. *Biochem J*, Jun 1;211(3):727-734.
- Okemoto K, Nakajima Y, Fujioka T, Natori S. (2002). Participation of two N-terminal residues in LPS-neutralizing activity of sarcotoxin IA. *J Biochem*, Feb;131(2): 277-281.
- Olsen, D; Yang, C; Bodo, M; Chang, R; Leigh, S; Baez, J; Carmichael, D; Perala, M; Hamalainen, ER, Jarvinen, M; Polarek, J. (2003). Recombinant collagen and gelatin for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 55: 1547-1567.
- Perler FB, Davis EO, Dean GE, Gimble FS, Jack WE, Neff N, Noren CJ, Thorner J, Belfort M. (1994). Protein splicing elements: inteins and exteins—a definition of terms and recommended nomenclature. *Nucleic Acids Res*, Apr;22(7): 1125-1127.
- Piers, KL; Brown, MH; Hancock, RE. (1993). Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria. *Gene*, Nov;134(1): 7-13.
- Raison, RL; Jorgensen, TO. (2002). Immunology and sustainable aquaculture. *Dev Comp Immunol*, 26: 129-130.
- Ramos-Onsins S; Aguadé M. (1998). Molecular evolution of the Cecropin multigene family in *Drosophila*. functional genes vs. pseudogenes. *Genetics*, Sep;150(1): 157-171.
- Rao XC, Li S, Hu JC, Jin XL, Hu XM, Huang JJ, Chen ZJ, Zhu JM, Hu FQ. (2004). A novel carrier molecule for high-level expression of peptide antibiotics in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2004 Jul;36(1):11-8.
- Robert, R; Miner, P; Nicolas, JL. (1996). Mortality control of scallop larvae in the hatchery. *Aquacult Int*, 4: 305-313.
- Sakai, M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172: 63-92.

- Salmonicultura (2000). Historia de la salmonicultura en Chile: El Cultivo del Éxito. Nov: 33-39.
- Sambrook, J; Fritsch, EF; Maniatis, T. (1989). "Molecular cloning". 2ª edición. Editorial Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarmasik, A; Warr, G; Chen, TT. (2002). Production of transgenic Medaka with increased resistance to bacterial pathogens. *Mar Biotechnol*, 4: 310-322.
- Sawyer, JG; Martín, NL; Hancock, RE. (1988). Interaction of macrophage cationic peptides with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 56: 693-698.
- Schein CH, Noteborn MH. (1989). Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Bio/Technology*. 6: 291-294.
- Scott, MG; Hancock, RE. (2000). Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Crit Rev Immunol*, 20: 407-431.
- Scott, MG; Davidson, DJ; Gold, MR; Bowdish, D; Hancock, RE. (2002). The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *J Immunol*, 169: 3883-3891.
- Sernapesca (2007). Informe Sanitario de la Acuicultura en Chile, Año 2006.
- Shai, Y. (1999). Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by  $\alpha$ -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta*, 1462: 55-70.
- Shan, J; Baguion, M; Zheng, L; Krishnamoorthi, R. (2003). Expression, refolding, and activation of the catalytic domain of human blood coagulation factor XII. *Protein Expr Purif*, 27: 143-149.
- Shen, SH. (1984). Multiple joined genes prevent product degradation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, Aug;81(15):4627-3461.

- Sherman, F., J. W. Stewart, and S. Tsunasawa. (1985). Methionine or not methionine at the beginning of a protein. *BioEssays*. Jul;3(1):27-31.
- Silvestro, L; Gupta, K; Weiser, JN; Axelsen, PH. (1997). The concentration-dependent membrane activity of Cecropin A. *Biochemistry*, 36: 11452-11460.
- Silvestro L, Axelsen PH. (2000). Membrane-induced folding of cecropin A. *Biophys J*. Sep;79(3):1465-1477.
- Skosyrev VS, Kuleskiy EA, Yakhnin AV, Temirov YV, Vinokurov LM. (2003). Expression of the recombinant antibacterial peptide sarcotoxin IA in *Escherichia coli* cells. *Protein Expr Purif*, Apr;28(2): 350-356.
- Snyder WB, Silhavy TJ. (1995). Beta-galactosidase is inactivated by intermolecular disulfide bonds and is toxic when secreted to the periplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, Feb;177(4): 953-963.
- Solbiati J, Chapman-Smith A, Miller JL, Miller CG, Cronan JE Jr. (1999). Processing of the N termini of nascent polypeptide chains requires deformylation prior to methionine removal. *J Mol Biol*. Jul 16;290(3):607-614.
- Spector, DL; Goldman, RD; Leinwand, LA. (1998a). Cells, a laboratory manual. Culture and Biochemical Analysis of Cells. Vol I. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Spector, DL; Goldman, RD; Leinwand, LA. (1998b). Cells, a laboratory manual. Light Microscopy and Cell Structure. Vol II. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Spector, DL; Goldman, RD; Leinwand, LA. (1998c). Cells, a laboratory manual. Subcellular Localization of Genes and their Products. Vol III. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Studier FW, Moffatt BA. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, May;189(1): 113-130.

- Subasinghe RP. (2005). Epidemiological approach to aquatic animal health management: opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic production through aquaculture. *Prev Vet Med*, Feb;67(2-3):117-124.
- Sung WS, Lee DG. (2008). Pleurocidin-derived antifungal peptides with selective membrane-disruption effect. *Biochem Biophys Res Commun*.
- Söderhall, K; Cerenius, L. (1992). Crustacean Immunity. *Annu Rev Fish Dis*, 2: 3-23.
- Tatner, MF; Manning, MJ. (1985). The ontogenic development of the reticuloendothelial system in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J Fish Dis*, 8: 189-195.
- Tencza, SB; Creighton, DJ; Yuan, T; Vogel, HJ; Montelaro, RC; Mietzner, TA. (1999). Lentivirus-derived antimicrobial peptides: increased potency by sequence engineering and dimerization. *J Antimicrob Chemother*, Jul;44(1): 33-41.
- Thune, RL; Stanley, LA; Cooper, RK. (1993). Pathogenesis of Gram-Negative Bacterial Infections in Warmwater Fish. *Annu Rev Fish Dis*, 3: 37-68.
- Tossi, A; Sandri, L; Giangaspero, A. (2000). Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 55: 4-30.
- Tossi, A; Sandri, L. (2002). Molecular Diversity in Gene-Encoded, Cationic Antimicrobial Polypeptides. *Curr Pharm Des*, 8: 743-761.
- Tsumoto K, Ejima D, Kumagai I, Arakawa T. (2003). Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr Purif*, Mar;28(1): 1-8.
- Uteng, M; Hauge, HH; Brondz, I; Nissen-Meyer, J; Fimland, G. (2002). Rapid two-step procedure for large-scale purification of pediocin-like bacteriocins and other cationic antimicrobial peptides from complex culture medium. *Appl Environ Microbiol*, 68: 952-956.
- Ventura S. (2005) Sequence determinants of protein aggregation: tools to increase protein solubility. *Microb Cell Fact*, Apr;4(1):11.

- Walsh, C. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, 406: 775-781.
- Wang W, Smith DK, Moulding K, Chen HM. (1998). The dependence of membrane permeability by the antibacterial peptide cecropin B and its analogs, CB-1 and CB-3, on liposomes of different composition. *J Biol Chem*, Oct;273(42):27438-27448.
- Westerhoff, HV; Juretic, D; Hendler, RW; Zasloff, M. (1989). Magainins and the disruption of membrane-linked free-energy transduction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 6597-6601.
- Whyte, SK. (2007). The innate immune response of finfish—a review of current knowledge. *Fish Shellfish Immunol*, Dec;23(6):1127-1151.
- Wickner W, Driessen AJ, Hartl FU. (1991). The enzymology of protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. *Annu Rev Biochem*, 60: 101-124.
- Xanthopoulos KG, Lee JY, Gan R, Kockum K, Faye I, Boman HG. (1988). The structure of the gene for cecropin B, an antibacterial immune protein from *Hyalophora cecropia*. *Eur J Biochem*, Mar;172(2): 371-376.
- Xiao Y, Dai H, Bommineni YR, Soulages JL, Gong YX, Prakash O, Zhang G. (2006). Structure-activity relationships of fowlicidin-1, a cathelicidin antimicrobial peptide in chicken. *FEBS J*, Jun;273(12):2581-2593.
- Xu HM, Zhang GY, Ji XD, Cao L, Shu L, Hua ZC. (2006). Expression of soluble, biologically active recombinant human endostatin in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2005 Jun;41(2):252-258.
- Xu X, Jin F, Yu X, Ji S, Wang J, Cheng H, Wang C, Zhang W. (2007). Expression and purification of a recombinant antibacterial peptide, cecropin, from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, Jun;53(2):293-301.
- Yamada K, Nakajima Y, Natori S. (1990). Production of recombinant sarcotoxin IA in *Bombyx mori* cells. *Biochem J*, Dec;272(3): 633–636.

- Yan, H; Hancock, RE. (2001). Synergistic interactions between mammalian antimicrobial defense peptides. *Antimicrob Agents Chemother*, 45: 1558-1560.
- Yang, L; Weiss, TM; Lehrer, RI; Huang, HW. (2000). Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. *Biophys J*, 79: 2002-2009.
- Yang, Y; Poncet, J; Garnier, J; Zatylny, C; Bachère, E; Aumelas, A. (2003). Solution Structure of the Recombinant Penaeidin-3, a Shrimp Antimicrobial Peptide. *J Biol Chem*, 278: 36859- 36867.
- Yeaman, MR; Yount, NY. (2003). Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacol Rev*, 55: 27-55.
- Yem, DW; Wu, HC. (1978). Physiological characterization of an *Escherichia coli* mutant altered in the structure of murein lipoprotein. *J Bacteriol*, Mar;133(3): 1419–1426.
- Yount, NY; Yeaman, MR. (2005). Immunocontinuum: perspectives in antimicrobial peptide mechanisms of action and resistance. *Protein Pept Lett*, Jan;12(1): 49-67.
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415: 389-395.
- Zemel, A; Ben-shaul, A; May, S. (2005). Perturbation of a lipid membrane by amphipathic peptides and its role in pore formation. *Eur Biophys J*, May;34(3): 230-242.
- Zhang, L; Falla, T; Wu, M; Fidai, S; Burian, J; Kay, W; Hancock, RE. (1998). Determinants of recombinant production of antimicrobial cationic peptides and creation of peptide variants in bacteria. *Biochem Biophys Res Commun*, Jun;247(3): 674-680.

## **15. APENDICE**

### **15.1 Medios de cultivo**

medio Luria Bertani (LB)

1% NaCl

1% peptona

0.5% extracto de levadura

medio mínimo esencial (MEM)

contiene dextrosa, sales inorgánicas, vitaminas y aminoácidos

## 15.2 Publicaciones generadas a partir del trabajo

Electronic Journal of Biotechnology (2008). April 15, Vol 11 (2) "Design and expression of a retro doublet of cecropin with enhanced activity". Díaz M; Arenas G; Marshall S.

Peptides (2008). April, Vol 29 (4), Pag. 512-519. "Characterization and functional recovery of a novel antimicrobial peptide (CEC<sub>dir</sub>-CEC<sub>ret</sub>) from inclusion bodies after expression in Escherichia coli". Schmitt P; Mercado L; Díaz M; Guzmán F; Arenas G; Marshall S.

En desarrollo. "Expression of antimicrobial peptides in Escherichia coli by intein-mediated system"