



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
(Medicina Molecular y Bioprocesos)**

“ β -defensinas humanas: Expresión heteróloga y actividad biológica”

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Ligia Luz Corrales García

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Gerardo Corzo Burguete, Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Joel Osuna Quintero, Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Luis Terán Juárez, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

CUERNAVACA, MORELOS

Agosto de 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

La presente Tesis fue realizada en el grupo de trabajo del Dr. Gerardo Alfonso Corzo Burguete, perteneciente al Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBt- UNAM), ubicado en la ciudad de Cuernavaca, Morelos.

Gracias al apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) mediante la beca para estudios de Doctorado número 229367, concedida a Ligia Luz Corrales García y a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM), proyecto IN200412

JURADOS DEL EXAMEN

Dra. Yvonne J. Rossenstein Azoulay

Dr. Mario Soberón Chávez

Dr. Humberto Flores Soto

Dr. Humberto Lanz Mendoza

Dr. Enrique Rudiño Piñera

Dedicado con mucho cariño,

A mis padres, hermanos y mi Salito.

*A mi precioso Dario, por ser mi amor y
amigo incondicional.*

Quiero expresar mi gratitud:

A mi padre Javier, mi madre Carlota, mis hermanos Jose y Javier, mi cuñada Paulina, mis 6 amorosas tías, mis millones de primos (Paulis, Anto, y demás) y a mi abuelita (aunque no esté físicamente), por su apoyo incondicional, ánimo y cariño, durante todo el tiempo de mis estudios, no obstante la distancia geográfica.

A mi hermosa sobrinita Salomé, por enseñarme cada día el valor de las cosas pequeñas.

A mi precioso Darío, por ser mi apoyo, mi amigo, mi guía y mi amor en todo momento, y por tener paciencia para permitir que pudiera culminar uno más de mis objetivos en la vida.

A las personas con quienes compartí mi residencia en Cuernavaca, quienes hicieron que sintiera el calor de un segundo hogar; en especial a Edna Lorena Hernández (Lore) por su permanente e incondicional apoyo, compañía y afecto.

De manera muy especial al Dr. Gerardo Corzo Burguete por haberme permitido ingresar a su grupo de trabajo, por confiar en mí, por sus enseñanzas y por su paciencia durante el desarrollo de mi proyecto de doctorado.

A los miembros del Comité Tutoral, Dres. Joel Osuna y Luis Terán, por sus aportes y sugerencias en cada etapa del proceso.

A los Dres. Lourival D. Possani Postay, Baltazar Becerril Luján y Alejandro Alagón Cano, por permitirme utilizar sus laboratorios y por los diferentes aportes durante la ejecución del proyecto.

A los miembros del Comité de Evaluación para la obtención del Título de doctor, Dra. Yvonne J. Rossenstein Azoulay, Dr. Mario Soberón Chávez, Dr. Humberto Flores Soto, Dr. Humberto Lanz Mendoza y Dr. Enrique Rudiño Piñera; su revisión crítica y acertada contribuyó a un mejor trabajo final.

A todos los tutores, profesores, académicos, personal administrativo y compañeros del Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca. De todos obtuve aprendizaje, en lo personal y en lo profesional.

A la Dra. Lidia Riaño Umbarila, por todas sus enseñanzas y su linda e invaluable amistad.

Al Dr. Ernesto Ortiz Suri, por todo el conocimiento y calidez que compartió conmigo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, porque al otorgarme una beca durante el doctorado, pude sentir éste proceso como un sueño hecho realidad.

A los integrantes del grupo de investigación del Dr. Gerardo Corzo Burguete, “*Los Corcitos*” (Kenya, Herli, Francia, Majo, Alexis, Vianey, Selma, Omar) por haber generado un ambiente de trabajo agradable, de aprendizaje y de mucha felicidad, durante todo este tiempo que hemos podido compartir.

A los integrantes del laboratorio de los Dres. Lourival D. Possani Postay y Baltazar Becerril Luján, Carmen, Linda (Emiliano y Emma), Chano, Timo, Fredy, Dr. Zamudio, Dra. Gina Gurrola, Itzel, Juanita, Rosby, Oscar, Miriam, Rosalba, Vero, Leo, Mónica, Nachito, Jimena (Juan Carlos y su rata), Martha (Diego), Rita (Pável y sus hermosas hijas), Everardo, Guille, Jonathan, Ilse. Gracias por los buenos momentos compartidos. Los voy a extrañar!!!

A mis amigos mexicanos por hacer de este tiempo el mejor, y mostrar siempre lo más bello de su admirable país; gracias por recibirme en su patria, solo tengo agradecimientos hacia ustedes.

A mis amigos colombianos en México por hacerme sentir en ocasiones como en mi patria y no permitirme olvidar mi acento.

TABLA DE CONTENIDOS

Resumen	I
Abstract	II
Abreviaturas	III
Lista de Tablas.....	V
Lista de Figuras	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Péptidos antimicrobianos	2
2.1.1 Clasificación de los péptidos antimicrobianos catiónicos.....	3
2.2 Defensinas.....	4
2.2.1 Las α -defensinas.....	6
2.2.2 Las β -defensinas.....	7
2.2.2.1 HBD1	9
2.2.2.2 HBD2.....	9
2.2.2.3 HBD3.....	10
2.2.2.4 HBD4.....	10
2.3 Expresión de proteínas heterólogas	11
2.3.1 Sistemas de expresión para β -defensinas.....	12
2.4 Mecanismos de acción antimicrobiana	15
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVOS.....	18
5.1 Objetivos generales	18
5.2 Objetivos específicos	18
6. MÉTODOS	19
6.1 Materiales	19
6.2 Diseño de oligonucleótidos para el ensamble de los genes de HBD2 y HBD3 20	
6.3 Clonación de los genes ensamblados	21
6.4 Diseño para la clonación de los genes de las β -defensina en los vectores de expresión.....	21
6.5 Construcción de vectores de expresión	23

6.6	Expresión heteróloga de las β -defensinas 2 y 3	24
6.7	Tratamiento de la proteína expresada en fracción soluble y en cuerpos de inclusión.....	25
6.8	Purificación de péptidos heterólogos	25
6.9	Plegamiento de los péptidos.....	25
6.10	Cambios en el gen de HBD2.....	26
6.11	Construcción de la β -defensina en tándem HBD3 y HBD2.....	27
6.12	Actividad antimicrobiana	28
6.13	Actividad anti- <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	29
6.14	Actividad hemolítica.....	30
6.15	Actividad quimiotáctica	30
6.16	Corte de péptidos con bromuro de cianógeno.....	31
6.17	Tratamiento estadístico.....	32
7.	RESULTADOS Y DISCUSION	33
7.1	Diseño y ensamble de genes de las defensinas humanas 2 y 3	33
7.2	Construcciones de vectores de clonación.....	34
7.3	Construcciones de vectores de expresión.....	36
7.4	Construcción del tándem.....	37
7.5	Expresión heteróloga y purificación de las β -defensinas humanas.....	39
7.5.1	Expresión y purificación de defensinas recombinantes en los plásmidos pQE40, pET32a(+) y pET22b(+)	41
7.5.2	Obtención de HBD3, HBD3-M y el tándem HBD3-M-HBD2, expresados en el vector pQE30	42
7.5.3	Estrategia para expresar HBD2: algunas variantes	47
7.5.4	Expresión pET28a::HBD2 y su variante pET28a::HBD2-KLK.....	50
7.6	Plegamiento de los péptidos.....	54
7.7	Determinación de la concentración de los péptidos heterólogos	56
7.8	Rendimientos en las expresiones	57
7.9	Corte con CNBr	59
7.10	Actividad antimicrobiana	60
7.11	Actividad anti- <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	63
7.12	Actividad hemolítica.....	65
7.13	Actividad quimiotáctica	66
8.	CONCLUSIÓN	68
9.	REFERENCIAS	69
	ANEXOS	A
	Anexo 1: Expresión y purificación de β -defensinas recombinantes en los plásmidos pQE40, pET32a(+) y pET22b(+).....	A
	A.1.1 Expresión y purificación de pQE40::HBD3.....	A

A.1.2 Expresión y purificación de HBD2 y HBD3 expresados en pET32a.....	C
A.1.3 Expresión pET22b::HBD2 y pET22b::HBD3.....	F
Anexo 2: Resultados de los plegamientos de las defensinas β-humanas expresadas en la investigación	H
Anexo 3: Diseño experimental para mejorar la expresión de HBD2.....	J
Anexo 4: Productos generados durante el desarrollo de la investigación.....	T
A.4.1 Artículo: Expression systems of human β -defensins: vectors, purification and biological activities	T
A.4.2 Artículo: Bacterial expression and antibiotic activities of recombinant variants of human β -defensins on pathogenic bacteria and <i>M. tuberculosis</i>	T

RESUMEN

Las β -defensinas humanas son péptidos antimicrobianos de naturaleza catiónica con una masa molecular de 2 a 5 kDa y un patrón de seis cisteínas conservado, los cuales forman tres puentes disulfuro. Las β -defensinas pertenecen a la primera línea de defensa del hospedero en contra de infecciones causadas por microorganismos. El creciente número de microorganismos multirresistentes ha conducido a la investigación y desarrollo de una nueva gama de antibióticos entre los que se encuentran las β -defensinas. Debido a la complejidad de su estructura, la expresión heteróloga de éste tipo de péptidos es una alternativa para generar cantidades suficientes para su evaluación clínica. Sin embargo, su producción recombinante puede presentar algunos problemas bioquímicos tales como, la toxicidad hacia el hospedero, la degradación del péptido por acción de proteasas intracelulares, su tamaño pequeño, la incertidumbre de lograr su plegamiento nativo, bajos rendimientos en la expresión, entre otros. En éste trabajo, 5 variantes de β -defensinas humanas (HBDs), la HBD2, HBD3 y tres más con un incremento en el número de cargas positivas (HBD2-KLK, HBD3-M y HBD3-M-HBD2), se expresaron en la bacteria *Escherichia coli* usando dos sistemas de expresión inducibles (pET28a(+) y pQE30). Las HBDs obtenidas, a partir de fracción soluble o insoluble dependiendo del sistema de expresión, generaron un rendimiento final entre 3 y 9.5 mg/L de cultivo celular con una pureza por encima del 90%. Se demostró que la actividad antimicrobiana de las HBDs recombinantes tiene una correlación directa con el número de residuos de aminoácidos cargados positivamente. Así la relación de actividad antimicrobiana y el número de cargas positivas fue HBD3-M-HBD2(+18)>HBD3(+12)=HBD3-M(+12)=HBD2-KLK(+10)>HBD2(+8), cuando se evaluaron sobre microorganismos como *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Por otro lado, al realizar evaluaciones sobre *Mycobacterium tuberculosis* (cepas H37Rv y multirresistente a antibióticos –MDR–) se encontró que la β -defensina HBD2-KLK presentó la mejor inhibición sobre H37Rv con una concentración 0.8 μ M; mientras la β -defensina HBD3-M-HBD2 registró la mejor actividad inhibitoria sobre la cepa MDR con una concentración de 3.3 μ M. Las pruebas de citotoxicidad demostraron que las HBDs son inocuas sobre eritrocitos humanos. En conclusión, las HBDs recombinantes pueden ser consideradas como potenciales moléculas candidatas para futuros compuestos terapéuticos de tipo antibiótico.

ABSTRACT

Human β -defensins are classified as cationic microbicidal peptides, which belong to the first-line of host defense against several microorganisms. They have a molecular mass from 2 to 5 kDa and contain a conserved disulfide-bridge pattern of three pairs of intramolecular cystine bonds. The well-known public health problem related to the fast-growing number of multiresistant bacteria has driven scientific research to look for novel antibiotics, such as β -defensins and a feasible way to produce them. Heterologous expression of β -defensins could be one way to generate large quantities of β -defensins for clinical research; however, heterologous expression of beta-defensins has some biochemical problems, such as toxicity toward the host cell, peptide degradation by proteolytic cell enzymes, size, folding constrains and low recombinant peptide yields. In this work, five variants of human β -defensins (HBDs) were expressed in *Escherichia coli* using two vector systems (pET28a(+) and pQE30) with inducible expression. The expressed proteins were named HBD2, HBD3, HBD2-KLK, HBD3-M and HBD3-M-HBD2, which are different in their lengths and overall basic charge. The HBDs were obtained as soluble or insoluble proteins depending on the expression system used, and the final protein yields ranged from 3 to 9.5 mg of peptide/L, with purities higher than 90%. The recombinant HBDs demonstrated a direct correlation between antimicrobial activity and the number of basic charged amino acid residues; that is, their microbicidal activity was as follows: HBD3-M-HBD2(+18)>HBD3(+12)=HBD3-M(+12)=HBD2-KLK(+10)>HBD2(+8) when assayed against *E. coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Interestingly, the increased positive charge peptide, HBD2-KLK, had the best antimicrobial activity (0.8 μ M) against the *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv. Meanwhile, the heterologous tandem peptide, HBD3-M-HBD2, had the finest minimal inhibitory concentration (MIC) value (3.3 μ M) against a multidrug resistance strain (MDR) of *M. tuberculosis*. Cytotoxicity tests proved that HBDs are harmless on human erythrocytes. The results of this work indicate that the recombinant HBDs could be considered as potential drug candidates for future therapeutic compounds such as antibiotics.

ABREVIATURAS

AcN	Acetonitrilo
BCA	Ácido Bicinconínico
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> o Albúmina de Suero Bovino
CAMP	Péptidos AntiMicrobianos Catiónicos
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CNBr	Bromuro de Cianógeno
DHFR	Dihidrofolato Reductasa
DTT	1,4-Ditiotreitol
ESI-MS	<i>Electro Spray Ionization</i>
FBS	Suero Fetal Bovino
GdnHCl	Cloruro de Guanidinio
GSH	Glutación reducido
GSSH	Glutación oxidado
GST	Glutathion S Transferasa
IC₅₀	Concentración de péptido que inhibe en un 50 % el crecimiento bacteriano
IPTG	Isopropil-1-tio- β -galactopiranosido
kDa	kilo Daltones
HBD	β -defensina Humana
IMAC	<i>Ion-metal affinity chromatography</i> , cromatografía de afinidad a ión metálico
L-EEO	Agarosa de baja electro-endosmosis
LPS	Lipopolisacáridos
mAU	mili-Unidades de Absorbancia
MDR	<i>Multi Drug Resistant</i> (Aislado clínico resistente a antibióticos)
MH	Medio Muller-Hinton
NaPB	<i>Buffer</i> Fosfato de Sodio
Ni-NTA	Ácido Ni-nitrilo triacético
OADC	Ácido Oleico, Albúmina, Dextrosa y Catalasa
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	<i>Buffer</i> Fosfatos salino
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pKS	Plásmido pBluescript KS(+)
REMA	<i>Resazurine Elisa Microplate Assay</i> (Ensayo de Resazurina en placas de Elisa)
rpm	Revoluciones por minuto
RP-HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> , medio de cultivo celular
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio

TFA	Ácido Trifluor Acético
Trx	Tiorredoxina
TSB	<i>Trypticase Soya Broth</i> (Medio líquido tripticasa soya)
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colonias por mililitro
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los péptidos antimicrobianos catiónicos de acuerdo a su estructura secundaria	3
Tabla 2. Características de las α - y β - defensinas	6
Tabla 3. Características de las β -defensinas humanas 1 a 4	11
Tabla 4. Sistemas de expresión y de clonación de las β -defensinas.....	13
Tabla 5. Secuencias de residuos de aminoácidos de las β -defensinas 2 y 3.....	20
Tabla 6. Secuencias de los oligonucleótidos sobrelapantes para los genes de las β -defensina 2 y β -defensina 3.	20
Tabla 7. Construcciones de los vectores de expresión	22
Tabla 8. Oligonucleótidos directo (F) y reverso (R) para construcciones de los vectores de expresión	22
Tabla 9. Oligonucleótidos para secuenciación de vectores de expresión	23
Tabla 10. Oligonucleótidos usados para realizar cambios en HBD2	26
Tabla 11. Oligonucleótidos usados para la generación de los megaprimers	27
Tabla 12. Secuencias finales de las β -defensinas humanas 2 y 3.	34
Tabla 13. Construcciones de vectores de expresión	37
Tabla 14. Construcciones de péptidos diseñados para ser expresados	40
Tabla 15. Purificación de defensinas heterólogas: porcentaje de acetonitrilo	55
Tabla 16. Masa moleculares y coeficientes de extinción molar teóricos de las defensinas humanas heterólogas en estados reducido y oxidado.....	57
Tabla 17. Pasos de purificación y rendimiento de la defensinas heterólogas.....	58
Tabla 18. Actividades antimicrobianas de las HBDs en medio líquido	61
Tabla 19. IC ₅₀ de los péptidos recombinantes	62
Tabla 20. Efecto antimicrobiano de los péptidos recombinantes HBDs sobre las cepas H37Rv y MDR de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	64
Tabla 21. Concentración óptima (nM) para la máxima quimiotaxis generada por los de péptidos heterólogos sobre las células THP-1	67
Tabla A- 1. Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo de expresión del péptido heterólogo HBD2 en <i>E. coli</i>	Q
Tabla A- 2. Coeficientes de regresión estimados para los factores significativos en la expresión de HBD2.....	R

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alineamiento de secuencias de las α -defensinas, mostrando los puentes disulfuro característicos entre las cisteínas	7
Figura 2. Alineamiento de secuencias de las β -defensinas, mostrando los puentes disulfuro característicos entre las cisteínas	8
Figura 3. Alineamiento de secuencias de residuos de aminoácidos de las diferentes mutantes de HBD2.....	26
Figura 4. Amplificación de los oligonucleótidos para empalmar el gen HBD3	34
Figura 5. Electroferograma que muestra los resultados de secuenciación para plásmidos pKS::HBD2 y pKS::HBD3.....	35
Figura 6. Genes construídos para diferentes vectores de expresión	35
Figura 7. Construcción del gen que codifica para el Tándem de HBD3 y HBD2.....	38
Figura 8. Obtención y purificación de HBD3 a partir del vector pQE30.....	43
Figura 9. Obtención y purificación de HBD3-M a partir del vector pQE30.....	44
Figura 10. Obtención y purificación de HBD3-M-HBD2 a partir del vector pQE30	45
Figura 11. Secuencias de HBD2 (PDB 1fd3) y HBD3 (PDB 1kj6) en las que se muestran las posiciones de las α -hélices y las hojas β	48
Figura 12. Modelado de HBD2 con la inserción de KLK en la región α -Hélice de su estructura	49
Figura 13. Algunas variantes de la construcción pQE30::HBD2	49
Figura 14. Inmuno- <i>blot</i> producto de expresión de variantes pQE30::HBD2 en la cepa <i>E. coli</i> M15[pRep]	50
Figura 15. Expresión y purificación de HBD2	52
Figura 16. Expresión y purificación de HBD2-KLK	53
Figura 17. Cromatograma de HBD3 obtenido a partir del proceso de oxidación.	55
Figura 18. Espectro de masa de HBD3 Oxidada	56
Figura 19. Corte de HBD3-M con CNBr.....	59
Figura 20. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de HBD3 sobre tres cepas patógenas.....	61
Figura 21. Inhibición del crecimiento de <i>S. aureus</i> en la determinación del IC ₅₀	62
Figura 22. Actividad hemolítica de los péptidos heterólogos tipo defensinas	66
Figura 23. Comparación de la capacidad quimioatrayente de HBD3 reducida y oxidada	67
Figura A- 1. Secuencia de HBD3 en el plásmido pQE40.....	A
Figura A- 2. Expresión de HBD3 en el plásmido pQE40	B
Figura A- 3. Purificación de HBD3 unida a la proteína de fusión DHFR.....	C
Figura A- 4. Expresión de HBD3 y HBD2 en el plásmido pET32a.....	D
Figura A- 5. Purificación de β -defensinas humanas unidas a Trx	E
Figura A- 6. Cromatograma y espectro de masas del corte de Trx-HBD2 con Factor Xa	F
Figura A- 7. Inmuno- <i>blot</i> de la expresión de pET22b::HBD2 y pET22b::HBD3	G
Figura A- 8. Masa molecular de HBD3M oxidada.....	H
Figura A- 9. Masa molecular de HBD3M-HBD2 oxidada	H
Figura A- 10. Masa molecular de HBD2 oxidada	I

Figura A- 11. Masa molecular de HBD2-KLK oxidada.....	I
Figura A- 12. Combinatoria de factores y niveles del diseño experimental.	K
Figura A- 13. Matriz experimental del Diseño Factorial para aumentar la producción del péptido recombinante HBD2	M
Figura A- 14. Comportamiento de los residuos dentro de una Normal.....	M
Figura A- 15. Relación entre las cantidades de biomasa, proteína total y proteína heteróloga como resultados del diseño experimental.....	N
Figura A- 16. Gráfica de probabilidad “Half-Normal”	O
Figura A- 17. Gráfico de coeficientes de los efectos y sus combinaciones para la obtención de proteína recombinante HBD2.....	P
Figura A- 18. Gráfico de superficie de respuesta	R

1. INTRODUCCIÓN

Los organismos multicelulares, plantas e inclusive mamíferos, se ven agredidos permanentemente por microorganismos potencialmente nocivos y esto los ha llevado a desarrollar mecanismos que les permiten defenderse activamente contra estos agresores. Si no hay heridas presentes, los sitios más probables de irrupción, por parte de estos microorganismos, son las superficies epiteliales como son piel, nariz, vías aéreas, pulmones, boca, tracto digestivo, sistemas reproductor y urinario. La respuesta inmune adaptativa del organismo o sistema de reconocimiento específico para la eliminación de los microorganismos y otros patógenos invasores, requieren de la proliferación clonal de inmunocitos (células B y T de defensa), cuyo desarrollo puede tomar entre días y semanas, de manera que el organismo debe disponer de una respuesta inmune innata que sea constitutiva o rápidamente inducible y para contraatacar al microorganismo invasor^{1,2}. En la medida en que las respuestas inmunes, humoral y celular, tengan la capacidad de funcionar³, no será necesario que el organismo reciba ayuda de agentes externos que le permitan luchar activamente en contra de estos patógenos, de lo contrario, los antibióticos o antivirales tendrán que ayudar en la defensa del organismo.

Debido al incremento en la resistencia a antibióticos por parte de muchos microorganismos, se ha despertado un interés, cada vez más creciente, por el sistema de defensa innato que posee el ser humano en contra de microorganismo agresores⁴. La primera molécula de naturaleza peptídica con estas características, fue descubierta por Alexander Fleming en 1922 y fue la proteína lisozima o muramidasa⁵. Desde entonces muchos péptidos antimicrobianos humanos han sido descubiertos, tales como la lactoferrina, neutrófilos humanos 1-6 (HNP1-6), el péptido antimicrobiano catelicidina 18 (hCAP18) y la familia de las β -defensinas^{1,6}.

Estas moléculas de naturaleza peptídica pueden ser sintetizadas químicamente, sin embargo su tamaño molecular representa un cuello de botella debido a que los rendimientos son bajos, y por tanto la cantidad de producto es limitada, al igual que su extracción de fuentes naturales. Sin embargo existe la posibilidad de usar sistemas heterólogos para la expresión de este tipo de péptidos antimicrobianos de origen humano. Esto abre una ventana a la utilización de dichas moléculas para ser empleadas como antibióticos alternativos en contra de microorganismos. Este trabajo tiene como finalidades expresar las β -defensinas humanas modelo 2 y 3 en un sistema heterólogo utilizando la bacteria *E. coli*, además realizar algunas modificaciones en la estructura primaria de la β -defensinas humanas 2 y evaluar así su actividad antimicrobiana en microorganismos patógenos y en modelos de células epiteliales.

2. ANTECEDENTES

2.1 Péptidos antimicrobianos

La eficiencia del sistema de defensa en los animales y plantas, puede atribuirse a la capacidad de sus sistemas inmunes, de reconocer y neutralizar microorganismos invasores, de manera rápida y específica. Detectar la presencia de microorganismos es el resultado de la unión de patrones moleculares asociados a patógenos, (PAMP por sus siglas en inglés)². Después de este reconocimiento, una respuesta antimicrobiana aguda es generada por el reclutamiento de leucocitos, fagocitos o por la producción de sustancias antimicrobianas en la zona afectada que permite controlar a una amplia variedad de patógenos^{2,7,8}.

Para evitar infecciones oportunistas, plantas, insectos, aves, crustáceos, anfibios y mamíferos, han desarrollado en sus epitelios, péptidos antimicrobianos catiónicos (CAMP), tales como las defensinas⁹. Se ha planteado que los CAMP, además exhibir actividad bactericida, también promueven la reacción del sistema inmune innato de los organismos¹⁰⁻¹². Esto puede llegar a explicar la inesperada resistencia que tienen a la infección, piel, tráquea y epitelio lingual^{6,13,14} a pesar de la constante exposición a los agentes agresores. Un organismo puede llegar a tener un número elevado de tipos diferentes de péptidos antimicrobianos, la mayoría de ellos de naturaleza catiónica³, que se producen por transcripción y traducción de un gen específico. El péptido es depositado rápidamente en el sitio de infección con un limitado gasto de energía y biomasa y repelen eficientemente a invasores patogénicos^{12,15}. Son parte de la respuesta inespecífica de hospederos multicelulares, tales como plantas, insectos, anfibios, aves y mamíferos^{8,16,17}, y carecen del reconocimiento de antígeno específico de los anticuerpos¹². Sin embargo tienen la capacidad de reconocer patrones moleculares entre los que se encuentran los lipopolisacáridos (LPS) y los ácidos lipoteicoicos, propios de bacterias patógenas³. Su función principal, es eliminar a los patógenos invasores, y se ha comprobado que participan en los procesos de la respuesta inmune inflamatoria³, lo que representa una orquestación entre los mecanismos de la inmunidad innata y adaptativa¹².

Se han planteado cuatro posibles razones que expliquen la gran variedad de péptidos antimicrobianos que pueden llegar a expresar los diferentes organismos. Primero, el espectro de actividad antimicrobiana de un péptido específico es incompleto, sugiriendo esto que la gama de péptidos antimicrobianos cubren las deficiencias inherentes en otros. Segundo, algunos péptidos pueden trabajar de manera sinérgica contra los microorganismos. Tercero, las actividades no relacionadas con la capacidad antimicrobiana (v.g. quimiotáctica o proinflamatoria) son variadas y también pueden llegar a ser complementarias entre los péptidos. Cuarto, los péptidos tienden a ser producidos por diferentes tipos de células, por lo tanto un tejido puede expresar un sólo tipo de péptido^{3,11,15,18}.

2.1.1 Clasificación de los péptidos antimicrobianos catiónicos

Los CAMP se caracterizan por tener secuencias de entre 12 y 50 residuos de aminoácidos, una carga positiva que puede estar entre +2 y +11, una elevada proporción de residuos de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina)¹⁹. Aproximadamente el 50% de sus residuos de aminoácidos son hidrofóbicos, de ahí su capacidad para interactuar con las membranas bacterianas como parte de su mecanismo de acción^{3,20}. Aunque forman parte de un mecanismo de defensa muy antiguo, solo recientemente se estableció que la generación de los CAMP está codificada por genes específicos¹⁹. Los CAMP reportados en todos los grupos de organismos, comparten propiedades catiónicas y anfipáticas similares, pero sus secuencias, estructuras secundarias y tamaños, varían ampliamente³. A pesar de ser pequeños, los CAMP, poseen un arreglo tridimensional que ha permitido clasificarlos en cuatro grupos, de acuerdo con las características estructurales, la composición de residuos de aminoácidos y el número de puentes disulfuro^{3,18} (Tabla 1).

- Estructura hoja- β , con dos, tres o cuatro uniones disulfuro intramolecular. Ocasionalmente tienen una estructura α -hélice
- α -hélices anfífilicas sin residuos de aminoácidos tipo cisteína
- α -hélices extendidas, libres de cisteínas, pero con alto contenido de un aminoácido en particular (prolina, arginina o triptófano)
- Estructura en forma de "loop" con un puente disulfuro intramolecular

Tabla 1. Clasificación de los péptidos antimicrobianos catiónicos de acuerdo a su estructura secundaria^{3,18}

Péptido	Estructura	Secuencia de residuos de aminoácidos*
β -defensina Humana	Hoja β	DHYNC ₁ VSSGQC ₂ LYSAC ₃ PIFT K IQGTC ₂ YRG KAKC ₁ C ₃ K
Protegrina 1 Cerdo	Hoja β	R GGRLC ₁ YC ₂ RRR FC ₂ VC ₁ VGR
LL-37 Humana	α -hélice	LLGDFFR K SK E KIG K E F K R IVQ R IKD F LRN L VP R TES
Histatina humana	α -hélice	DSHA K RHHGY K R K FHE K HH S H R GY
Indolicina Bovino	α -hélice extendida	ILPW K WPW W P W RR
PR 39 Cerdo	α -hélice extendida	R RR P RP P YL P RP R PP P FP P RL P RP R IP P GF P RP P RP P
Bactenicina Bovino	Loop	R LC ₁ R I V V IR V C ₁ R

*Aminoácidos presentados en código de una letra. Residuos de aminoácidos cargados positivamente a pH fisiológico en negrilla. Los subíndices representan la unión de puentes disulfuros.

Otros péptidos antimicrobianos catiónicos, como la lactoferrina, se forman por la digestión proteolítica de proteínas catiónicas de gran tamaño³. También es el caso de las catelicidinas,

que se almacenan como propeptidos inactivos y que son procesados tras la estimulación. En los neutrófilos de cerdos y bovinos el procesamiento de la catelicidina se da por la elastasa allí presente, y luego se libera en forma de péptido activo al fluido extracelular. Dentro de la catelicidinas se encuentran las protegrinas de cerdo, batenecina e indolicina de ganado bovino y CAP18 de conejos. En humanos, solo se ha reportado la catelicidina LL37/hCAP18 cuyo gen codificante se encuentra en el cromosoma 3. Su expresión se ha detectado en precursores de células mieloides, testículos, queratinocitos y epitelio aéreo. Las catelicidinas y las defensinas exhiben una actividad antimicrobiana sinérgica, sugiriendo que ambas participan en una respuesta de defensa combinada³. Otro péptido antimicrobiano reportado en humanos es la RNasa 7, que es una proteína antimicrobiana epitelial inducible, que puede ser importante en el sistema de defensa inmune del epitelio humano. Se ha hipotetizado que la RNasa 7 puede jugar un papel importante en el sistema de defensa, puesto que su expresión y la de las defensinas humanas HBD2, HBD3 y HBD4, se ha detectado su en queratinocitos cuando éstos han sido retados con bacterias patógenas²¹.

2.2 Defensinas

Las defensinas encontradas ampliamente en plantas, insectos y mamíferos^{22,23}, son una familia de péptidos antimicrobianos catiónicos endógenos, con un amplio espectro de actividad bactericida sobre bacterias Gram (+), Gram (-), varios hongos patógenos (incluyendo aquellos resistentes a azoles)^{6,16}, virus encapsulados y protozoos^{6,7,16,24}. Se ha demostrado que las defensinas no tienden a generar resistencia en bacterias patógenas²⁵. Debido a su amplia distribución en la naturaleza, se considera que son moléculas muy antiguas con ancestros comunes que surgieron hace millones de años¹². Las defensinas en general aumentan la respuesta inmune de los organismos²³, pueden inhibir el crecimiento o la patogenicidad de microorganismos, ya sea directamente o por incremento de la respuesta inmune del hospedero¹², tales como leucocitos, células Paneth del intestino delgado y células epiteliales de barrera. En procesos de respuesta a una infección, las defensinas pueden ser generadas en minutos o en horas por los neutrófilos o por las células especializadas²⁶. En los humanos el locus de las defensinas se encuentra en el cromosoma 8p21-23, donde se colocan tanto las α como las β -defensinas. Los genes de las defensinas tienen una identidad de secuencia media al interior de cada grupo, pero son muy diversas entre los grupos. La caracterización del ARNm de las defensinas indica que los péptidos son sintetizados como moléculas precursoras, que incluyen una secuencia señal seguida de una región de pro péptido, que posteriormente se procesa para obtener el péptido maduro³. Los péptidos maduros de esta subfamilia, poseen similitudes: secuencias cortas de polipéptidos (18 a 45 residuos de aminoácidos), tres puentes disulfuro intramoleculares (que estabilizan la triple hoja- β antiparalela¹⁶), carga catiónica neta (rango entre +1 y +11), carecen de modificaciones glicosiladas o aciladas en sus cadenas laterales²⁷ y la mayoría de los péptidos antimicrobianos poseen al menos el 50% de sus residuos de aminoácidos hidrofóbicos, muy pocos polares

neutros o cargados negativamente¹¹.

En las plantas, las primeras defensinas halladas, fueron nombradas como γ -tioninas y éstas se aislaron de trigo y cebada durante la década de los 90; posteriormente se demostró que estaban distribuidas a lo largo del reino vegetal. Las defensinas de plantas son pequeñas (45 – 54 residuos de aminoácidos), básicas, ricas en cisteínas (posiciones conservadas) y poseen actividades antimicrobianas en concentraciones micromolares. Tienen un amplio espectro de acción sobre hongos fitopatogénicos, como *Fusarium culmorum* y *Botrytis cinerea* y patógenos humanos como *Candida albicans*, pero no son tóxicos para células de mamíferos o plantas^{11,28}. El plegamiento, consiste en una α -hélice y una triple hoja- β , con una arquitectura $\beta\alpha\beta\beta$ que es estabilizada por cuatro puentes disulfuro y son estructuralmente homólogas a las defensinas de humanos. Su mecanismo plantea la inducción de la permeabilización de membrana por interacción específica con ciertos sitios de las paredes de los hongos, identificados como esfingolípidos²⁸.

En mamíferos, las defensinas fueron primero identificadas en conejos, como una familia de péptidos y posteriormente en otras especies, incluyendo la α -defensinas en neutrófilos (NHP-1 – 4) del humano^{14,23,28}. Dentro de dichos péptidos antimicrobianos de mamíferos, se encuentran las α -defensinas, β -defensina y θ -defensinas²⁹. El plegamiento de las defensinas comprende hojas β antiparalelas y hélices α y algunas son estabilizadas por puentes disulfuro en una forma compacta, como es el caso de las β -defensinas. Las θ -defensinas de mamífero son péptidos cíclicos derivados de α -defensinas¹². Las α - y β - defensinas difieren en su tamaño y en la disposición de la unión entre las cisteínas²⁸ (Ver Tabla 2). Mientras que las θ -defensinas se han encontrado en monos del viejo mundo y tienen un amplio espectro de actividad antiviral y están ausentes en humanos debido a la presencia de un codón de término en el gen correspondiente. Las θ -defensinas tienen actividad anti-HIV y su ausencia en humanos se ha discutido como una posible causa a la infección del HIV y del SIDA⁹, esto sugiere que la ausencia o presencia de un péptido antimicrobiano específico, puede afectar la resistencia o susceptibilidad a un patógeno.

Tanto α - como β -defensinas, juegan un papel muy importante tanto en el sistema de defensa primaria de humanos contra infecciones como en la señalización de unión entre los sistemas de inmunidad innata y adaptativo mediante la atracción de células dendríticas inmaduras y células T de memoria^{30,31}. En contraste con las α -defensinas y la β -defensina-1 que tienen una expresión constitutiva, las β -defensinas 2, 3 y 4 pueden tener una expresión inducible por efecto de varios agentes proinflamatorios^{1,6}. La evidencia de su actividad antimicrobiana se infiere a partir de experimentos que demuestran que las preparaciones de las α -, β - y θ -defensinas purificadas, pueden matar una gran variedad de microorganismos *in vitro*, llegando a ser microbicidas efectivos en rangos de concentraciones entre 0.5 y 5 μM ^{2,6,17,24,25,28,31-33}.

Tabla 2. Características de las α - y β - defensinas

α -Defensinas	β -Defensinas
Tres puentes disulfuro (1-6, 2-4, 3-5). Carecen de α -hélices ¹²	Tres puentes disulfuro (Uniones 1-5, 2-4, 3-6). Poseen α -hélices
Contienen de 29 a 35 residuos de aminoácidos; sintetizados como prepro péptidos (93 a 100 residuos de aminoácidos) ¹⁶	Poseen alrededor de 35 residuos de aminoácidos; sintetizados como prepro péptidos (64-68 residuos de aminoácidos) ¹⁶
Se encuentran en células Paneth y almacenadas en neutrófilos humanos, su función parece ser destruir los microorganismos fagocitados por neutrófilos ¹⁶ .	Se expresan predominantemente en tejidos epiteliales
Se han descritos seis moléculas de α -defensinas humanas: HNP-1, HNP-2, HNP-4, HD-5, HD6 y HNP-3 (que es una α -defensina humana truncada) ¹⁶	Se han detectado en el organismo, 4 moléculas de β -defensina humana: HBD1, HBD2, HBD3, HBD4 ¹⁶ . Pero se conoce la secuencias hasta la HBD36 ³⁴
Tienen un amplio espectro de actividad contra Gram (+) y Gram (-), hongos y virus encapsulados ^{14,16}	

2.2.1 Las α -defensinas

Identificadas como proteínas antimicrobianas catiónicas, se producen en neutrófilos y células Paneth del intestino³⁵. Fueron purificadas a partir de extractos citoplasmáticos de leucocitos polimorfonucleares, donde se encuentran presentes 4 α -defensinas (HNP-1 – 4) y una catelecticina (hCAP-18/LL-37); otras dos α -defensinas humanas (HD-5 – 6), se expresan principalmente en las células Paneth del intestino delgado²³. Las α -defensinas son almacenadas en gránulos primarios y requieren de procesamiento para adquirir potencia antimicrobiana²⁹. Las caracterizaciones moleculares mostraron que son catiónicas, poseen tres puentes disulfuro (Figura 1); están presentes en primates (humanos y macacos), conejos y varios roedores (ratas, hámster)². Su biosíntesis en forma de ‘pre-pro- α -defensina’, involucra el corte del péptido señal para generar la ‘pro- α -defensina’, de la que se ha reportado muy poca o ninguna actividad antimicrobiana *in vitro*, la activación del péptido requiere de la remoción proteolítica del ‘propice’, que tiene aproximadamente 40 residuos de aminoácidos y confiere balance de cargas al ‘pre-pro-péptido’, minimizando la auto-toxicidad para la célula productora².

Las α -defensinas, poseen actividad antibacteriana sobre microorganismos Gram (+), Gram (-), algunas levadura y virus, pero llegan a ser activas solo a concentraciones de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$;

por ejemplo, se ha demostrado que la actividad antimicrobiana de las α -defensinas humanas contra *C. albicans*, es baja en comparación con las derivadas de otras especies. Es el caso de HNP-1, las más activa de las α -defensinas humanas y es aproximadamente solo el 10% tan potente como la defensina NP-1 de conejo contra dicha levadura¹⁶. De manera que se considera que el accionar de éstas defensinas está asociado a leucocitos y deben ser usadas para matar microorganismos fagocitados¹⁴. También tienen la capacidad de proteger al hospedero por su capacidad de quimio-atrayente de células T, promoviendo la inmunidad del mismo y activando la vía clásica del complemento³⁵.

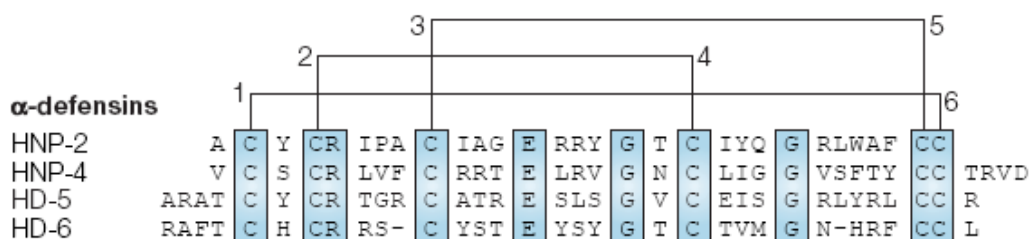


Figura 1. Alineamiento de secuencias de las α -defensinas, mostrando los puentes disulfuro característicos entre las cisteínas²⁹

2.2.2 Las β -defensinas

Desde 1995, al menos 4 β -defensinas se han caracterizado en humanos, conocidas como β -defensina-humana 1 – 4 (HBD1 – 4)^{6,22}. Son péptidos antimicrobianos pequeños (~5 kDa), básicos, anfifílicos, ricos en unidades de cisteína, catiónicos, con un amplio espectro de actividad microbicida frente a bacterias y hongos^{12,16}. Son moléculas con una carga neta positiva entre +2 y +11 y exhiben superficies tanto catiónicas como hidrofóbicas, propiedades consideradas como prerequisites para su capacidad de irrumpir membranas biológicas *in vitro*, además de poseer una naturaleza anfifílica marcada, como monómero¹⁴. Todas las defensinas son sintetizadas como ‘pre-pro-péptidos’ y la expresión de las cuatro β -defensinas humanas es inducible en uno o más tejidos, aunque la HBD1 tiene expresión constitutiva en algunos tejidos epiteliales^{2,16,22,23,26,27}.

Las β -defensinas pertenecen a la familia de los péptidos antimicrobianos catiónicos ricos en cisteína^{14,16,17} con tres puentes disulfuro intramoleculares conservados³¹ (Figura 2). Han sido halladas solo en vertebrados, incluyendo mamíferos y aves¹⁴; encontrados inicialmente en granulocitos y en tejido epitelial de células de tráquea de bovino²³. Su función es contribuir a la defensa temprana de un organismo contra una gran cantidad de bacterias y hongos patógenos activando la respuesta inmune innata¹²; además, tienen la capacidad de atraer monocitos, sugiriendo una posible interacción entre la expresión antimicrobiana y la inflamación²⁴, así, las β -defensinas pueden promover la respuesta inmune adaptativa de vertebrados, reclutando células dendríticas y células T al sitio de la invasión microbiana³⁵.

Están presentes en leucocitos, células epiteliales del tracto respiratorio, riñones, vagina y tracto urogenital^{17,32,35}, donde pueden expresarse por efecto de la invasión de microorganismos o ser regulados por la estimulación con lipopolisacáridos o por el factor de necrosis tumoral (TNF- α)^{13,35}. Se considera que la naturaleza anfífilica de las β -defensinas es determinante para su actividad antimicrobiana¹⁴, pero la presencia de sales y cationes en el medio puede inactivarlas e impedir su función antimicrobiana¹². Ésta puede ser parte de la explicación de la aparición de infecciones recurrentes en pacientes con fibrosis quística³⁵.

Hasta el momento no se ha observado resistencia adquirida en contra de los péptidos antimicrobianos³² y debido a sus mecanismos de acción, se espera que se conviertan en los agentes terapéuticos ideales como péptidos antibióticos, que puedan llegar a mitigar el problema de la resistencia^{13,25,31}. Producir estos péptidos usando técnicas recombinantes, podrá acelerar y profundizar en la investigación de su potencial farmacéutico y sus aplicaciones clínicas. Algunas investigaciones indican que las HBD tienen la capacidad de atraer células dendríticas inmaduras y células T de memoria por medio del receptor CCR6, extendiendo así un puente de unión entre la defensa epitelial innata y la inmunidad adaptativa²⁰.

El primer péptido β -defensina, HBD1, fue purificado a partir de hemofiltrados¹⁷; HBD2 y HBD3, se aislaron de la piel de pacientes que padecían psoriasis^{13,20} y han sido caracterizadas estructural y funcionalmente. La expresión de la cuarta β -defensina, HBD4, ha sido caracterizada a nivel de ARNm³². La expresión de HBD-5 y HBD-6, se ha detectado en el epidídimo. Además se han elucidado las secuencia de las β -defensinas de la 5 a la 36 por medio del uso de herramientas bioinformáticas con sus secuencias y alineamientos que permiten ver el consenso en las posiciones de las cisteínas, pero en el resto de las estructuras es poco conservada³⁴.

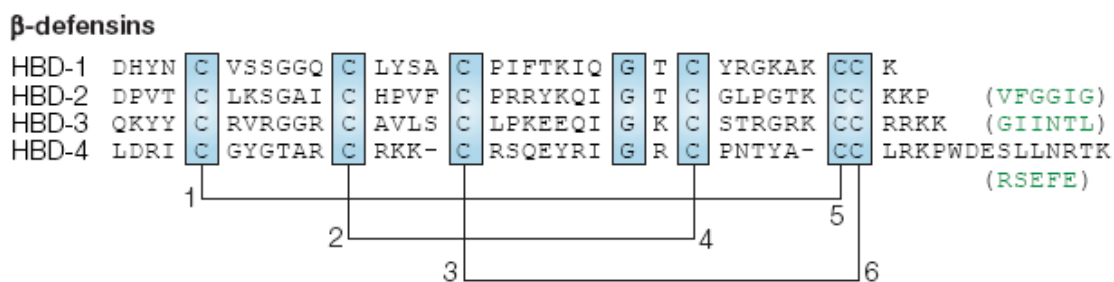


Figura 2. Alineamiento de secuencias de las β -defensinas, mostrando los puentes disulfuro característicos entre las cisteínas²⁹

2.2.2.1 HBD1

Inicialmente aislada de hemofiltrado¹⁷, presenta características similares a la β -defensina de neutrófilo de bovino (péptidos antimicrobianos de la tráquea –TAP–), de ahí que su nombre sea β -defensina-1 (HBD1). Representa el primer miembro de la familia de las β -defensinas humanas^{14,17}, cuenta con 47 residuos de aminoácidos. Se expresa constitutivamente en células epiteliales, particularmente en aquellas del páncreas y riñón²⁹, en células epiteliales del tracto urinario, tracto respiratorio, queratinocitos^{3,6,14} y en los ductos sudoríparos de la dermis²¹. Pero los niveles de ARNm no se modificaron bajo la influencia de la presencia de microorganismos retardadores³. HBD1 también se expresa en el epitelio de la glándula mamaria de mujeres, la expresión de esta proteína, bien podría brindar protección contra la mastitis o contribuir a la defensa del neonato²³. Posee un poderoso efecto sobre *E. coli*¹⁴ (Ver Tabla 3).

2.2.2.2 HBD2

Aislada inicialmente a partir de escamas de piel de pacientes con psoriasis²⁰ por medio de cromatografía de afinidad bacteriana^{13,14,22}; también se ha aislado de nariz, mucosa oral, ducto lacrimal, epitelio superficial ocular y epitelio intestinal en respuesta a una infección e inflamación²². La HBD2 es un péptido catiónico rico en cisteína que consta de 41 residuos de aminoácidos presentes en el péptido maduro y en la secuencia líder, lo que puede indicar que es un péptido secretado^{13,36}, su punto isoeléctrico (*pI*) teórico es 9.3 y tiene una naturaleza anfífilica¹⁴. Ya que la HBD2 se encuentra distribuida por todo el epitelio de muchos órganos, se considera que juega un papel sistémico muy importante en la inmunidad innata³⁶ y adaptativa del organismo contra la invasión de microorganismos, por atracción de las células dendríticas inmaduras y de las células T de memoria^{14,37}. Su síntesis se induce por la presencia de microorganismos como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Candida albicans* y otros factores proinflamatorios como interleuquinas y citoquinas (factor necrosis tumoral- α -TNF α - y IL-1 β) y en menor grado por algunos microorganismos Gram (+)^{3,13,14,22,23,36}. Presenta poderosas actividades antimicrobianas sobre *E. coli*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*^{13,14} y actividad bacteriostática sobre el microorganismo Gram (+) *Staphylococcus aureus*¹³. Las investigaciones conducen a demostrar que tiene actividad antimicrobiana preferencial sobre Gram (–) y levaduras, aunque su efecto sinérgico es observable y comparable con la lisozima y la lactoferrina³⁶. Es sensible a la sal³¹ y es así como en la fibrosis quística, la HBD2 es menos efectiva sobre la *P. aeruginosa*, debido a la relativamente alta concentración de sales presentes en el medio como consecuencia del defecto en los canales de Cl[–]^{6,14} (Ver Tabla 3).

2.2.2.3 HBD3

Hallada inicialmente por prospección del gen que agrupa a HBD1 y HBD2. Su expresión se detectó posteriormente en lesiones de piel con psoriasis, en queratinocitos²⁰, así como en otros tejidos epiteliales²², tejido cardíaco adulto, músculo esquelético, placenta, en timo fetal²³ y se detectó elevada expresión de ARNm en la piel y en las amígdalas²⁰. Contiene 45 residuos de aminoácidos y 6 unidades de cisteína con la unión entre ellas, característica de β -defensinas y una carga catiónica neta de +11^{25,35,38}. Gran cantidad de estudios *in vitro*, han demostrado la marcada actividad antimicrobiana, anti-fúngica, anti-viral^{20,25,33} y ha sido reportada como un antimicrobiano no hemolítico²⁰. A diferencia de otras defensinas humanas que son sensibles a altas concentraciones de sal, la HBD3 mantiene su amplio espectro de actividad en presencia de concentraciones salinas fisiológicas^{20,25}, también ha demostrado tener baja toxicidad sobre las células hospederas²⁵ (Ver Tabla 3).

Entre las β -defensinas, la HBD3 es la que exhibe la actividad antibacteriana más fuerte sobre bacterias Gram (+), inclusive *S. aureus*^{23,38}, posiblemente debido al hecho de ser un péptido más básico y con mayor cantidad de cargas positivas^{25,38}. La densidad de carga está asimétricamente distribuida sobre la superficie molecular de HBD3 y es el incremento de la carga neta positiva la causa parcial de la baja similitud con las secuencias HBD1, HBD2, además HBD3 posee una gran inserción de residuos cargados en el C-terminal, se cambia la treonina conservada antes del cuarto residuo de cisteína por una lisina y se reemplazan los residuos 8, 12, 14 y 17 por residuos de aminoácidos catiónicos³⁸.

2.2.2.4 HBD4

La HBD4 fue hallada por el análisis de secuencia en el cromosoma 8p23⁶. La mayor expresión de esta defensina, se encontró en testículos y en la cavidad gástrica^{22,23}. Una muy baja expresión constitutiva se detecta en neutrófilos, útero, tiroides, pulmones y riñones, pero su expresión se ve aumentada en las células epiteliales respiratorias ante la exposición a bacterias (*P. aeruginosa*, *S. pneumoniae*)²³. Su concentración se incrementa durante los desórdenes inflamatorios (Ver Tabla 3).

Tabla 3. Características de las β -defensinas humanas 1 a 4

HBD1	HBD2	HBD3	HBD4
68 residuos de aminoácidos (47 en péptido maduro y una secuencia líder ¹³); 3.9 kDa; carga neta +4	64 residuos de aminoácidos (41 en péptido maduro y una secuencia líder ¹³); 4.3 kDa; carga neta +7	67 residuos de aminoácidos (45 en péptido maduro y una secuencia líder); 5.2 kDa; carga neta +11	72 residuos de aminoácidos (50 en péptido maduro y una secuencia líder) ³⁹ ; carga neta +11
Aislada de hemofiltrado ¹⁷	Aislada de lesiones de psoriasis (cromatografía de afinidad) ¹³	Aislada de lesiones de psoriasis, piel, células epiteliales nasales ^{6,20} , músculo y corazón	Detectada usando bioinformática y análisis genómico funcional
Expresión constitutiva en células epiteliales de tráquea, bronquios, vías aéreas y glándula mamaria ¹⁴ . Se encuentra en riñones, placenta, páncreas, glándula prostática ⁶ , tracto urogenital ³²	Expresión inducida (por factor tumoral α , lipopolisacáridos, IL1- β) en queratinocitos, mucosa gingival, epitelio de la tráquea, ¹⁴ piel, tractos respiratorio y gastrointestinal ³²	Expresión inducida por factor tumoral α , interferón γ ³² . Presente en queratinocitos, epitelio gastrointestinal y tracto respiratorio ^{6,20,32}	La expresión se ha detectado en testículos ³² y cavidad gástrica. Expresión constitutiva baja hallada en neutrófilos, epitelio de la glándula tiroides, pulmones, útero y riñones ^{1,26}
Actúa sobre bacterias Gram (-) (<i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i>) y levaduras (<i>C. albicans</i>)	Actúa sobre bacterias Gram (-) (<i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i>) y levaduras (<i>C. albicans</i>)	Actúa sobre bacterias Gram (-) (<i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i>) y levaduras (<i>C. albicans</i>), bacterias Gram (+) (<i>S. pyogenes</i> , <i>S. aureus</i>) ²⁰	Actividad antimicrobiana baja contra <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. neumoniae</i> y <i>B. cepacea</i> . Actividad elevada contra <i>P. aeruginosa</i>

2.3 Expresión de proteínas heterólogas

El número de péptidos y proteínas de naturaleza terapéutica y de origen recombinante, se ha incrementado dramáticamente en la última década. Ha aumentado el número de medicamentos aprobados provenientes de procesos recombinantes, ya sean proteínas o anticuerpos monoclonales, desde la aprobación de la insulina recombinante en 1982⁴⁰. Pero aún así éstas expectativas, no pueden dejarse de lado circunstancias tales como el desarrollo de la formulación de los productos, las pruebas clínicas para su uso, además de la estabilidad de los mismos en el tiempo de anaquel (1 – 2 años) antes de ser usado en un paciente. Gran cantidad de dichas proteínas recombinantes se obtienen a partir de sistemas bacterianos, que se consideran los más atractivos debido a su rápido crecimiento, a la alta densidad de producto que generan en sustratos de bajo costo, a su genética bien caracterizada y la disponibilidad de, gran cantidad de vectores de clonación y cepas hospederas mutantes⁴¹.

Sin embargo la elección del hospedero y del sistema promotor de expresión adecuados para la obtención de una proteína de interés específica sigue siendo difícil y bastante racional⁴¹. La selección de cepas de *E. coli* con baja actividad proteolítica y la selección cuidadosa del plásmido para prevenir la actividad tóxica de la β -defensina, puede ser determinante para la obtención de péptidos catiónicos antimicrobianos³⁷. Dentro de todos estos diseños se ha contado, por ejemplo, con diferentes proteínas de fusión que unidas al péptido de interés, tienen como función protegerlo de la degradación, impedir la actividad antimicrobiana del péptido de interés en contra de la célula hospedera y además ser expresado en la fracción soluble⁴², finalmente esta proteína de fusión puede ser liberada por acción proteolítica específica, sin dejar ningún residuo de aminoácido adicional en la región N-terminal^{31,41,42}.

2.3.1 Sistemas de expresión para β -defensinas

Para la producción de proteínas heterólogas, se han estudiado, desarrollado y establecido una serie de sistemas de expresión, tales como células procariotas, levaduras, virus, células de mamíferos⁴¹. *Escherichia coli* es una de las células más comúnmente empleadas como sistema de expresión, debido a su amplio conocimiento genético y a la abundante cantidad de plásmidos disponibles. Algunas dificultades se tienen en cuanto a la expresión de los genes que codifican para péptidos antimicrobianos, debido a su toxicidad y a la potencial degradación del péptido por las enzimas proteolíticas del microorganismo. Pero si los péptidos son sintetizados en forma de compuestos insolubles, llamado cuerpos de inclusión, pueden evitarse estos inconvenientes^{41,42}. Otros sistemas se han utilizado para la obtención de β -defensinas humanas, la levadura *Sacharomyces cerevisiae* AH22, donde se obtuvo el producto de interés en la fracción soluble aunque con muy bajos rendimientos y sin plegamiento comprobado⁴³. También se han evaluado de expresión de diferentes β -defensinas humanas en sistemas libres de células, obteniendo también el producto en la fracción soluble, con bajo rendimiento y sin comprobar plegamiento ni actividad antimicrobiana^{36,44}.

Uno de los puntos más importantes que determina una expresión de proteínas heterólogas, es su plegamiento nativo, principalmente la correcta unión de los puentes disulfuro, que permiten que las moléculas obtenidas por estrategia recombinante sean biológicamente activas⁴⁵. De ahí que sea necesario evaluar y considerar las potencialidades de algunos vectores y sistemas de expresión y de clonación. Aunque se ha reportado la presencia de actividad antimicrobiana sin la necesidad del plegamiento correcto de la HBD, pero si se afecta su capacidad quimioatrayente, por ende se deduce que la actividad quimiotáctica está directamente relacionada con el plegamiento adecuado de la defensina humana⁴⁶.

En la Tabla 4 se hace referencia a algunas β -defensinas, obtenidas por expresión heteróloga, usando diferentes sistemas de expresión y de clonación.

Tabla 1. Sistemas de expresión y de clonación de las β -defensinas

	HBD-1	HBD-1	HBD-2	HBD-2	HBD-2	HBD-2
Plásmido de clonación	pBluescript II SK (+)	pBluescript II SK (+) y pPIC9K	pGEM-T	pGEM-T	pGEM-shBD2	No
Cepa de clonación	<i>E. coli</i> TG1	<i>E. coli</i> TG1	<i>E. coli</i> TG1	<i>E. coli</i> DH5a	<i>E. coli</i> DH5a	<i>E. coli</i> TG1
Plásmido de expresión	pLMM	pVT103L	pET-32 (+)	pET-28a (+)	pIVEX2.4c-TrxA-shBD2	pET-32a (+)
Cepa de expresión	<i>E. coli</i> AD202	<i>S. cerevisiae</i> AH22	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Free Cell system (CECF)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)
Proteína de fusión	LMM	No	TrxA	N-term+35aa + 6-His	TrxA (de pET32)	TrxA
Promotor	Lac	ADH1	T7/Lac	T7/Lac	T7	T7/Lac
Condiciones de cultivo	37°C 0.7-0.8 OD	28°C, 250 rpm; 120h 0.5 OD	37°C, 250 rpm; 0.7 OD	30°C, 200 rpm 0.4 OD	30°C, 990 rpm, 24h	37°C, 250 rpm 0.4 OD
Inductor	100 μ M IPTG	Ninguno	0.8 mM IPTG	0.8 mM IPTG	Ninguno	0.8 mM IPTG
Tiempo de expresión	8h	No	8h	4h	No	8h
Temperatura de inducción	37°C	No	37°C y 28°C	37°C	No	25 y 28°C
Rendimiento	1 mg HBD1/ 6g células (peso seco)	55 μ g/L	346mg/L 28°C; 235mg/L 37°C	DNS	2mg/mL- CECF	1.3 g/L batch de 10L
Etiqueta de histidinas	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí
Proteína	soluble	soluble	soluble	soluble	soluble	soluble
Datos de plegamiento	No	No	No	No	No	No
Actividad biológica	<i>E. coli</i> Aislados clínicos	<i>E. coli</i> ML35-p (dosis 150 ng)	<i>E. coli</i> K12D31 >5 μ g/ml	ND	<i>E. coli</i> D31	No
Medio de cultivo	LB	YPD (para crecimiento) y TSB (antimicrobiano)	LB, MBL	2xYT	Kit para expresión en sistemas libre de células	LB y MBL (fermentador)
Referencia	Cipáková <i>et al.</i> 2004	Cipáková <i>et al.</i> 2005	Xu <i>et al.</i> 2006	Fang <i>et al.</i> 2002	Chen <i>et al.</i> 2005	Peng <i>et al.</i> 2004

	HBD-3	HBD-3 -4	HBD-3	HBD-3	HBD-4	HBD-5-6	HBD-26-27
Plásmido de clonación	pGEM-T	pET32-shBD3 pET32-shBD4	pGEX-KG	pGEM-T	pGEM-T	pDrive	pDrive
Cepa de clonación	<i>E. coli</i> DH5 α	<i>E. coli</i> DH5 α	<i>E. coli</i> Top 10	<i>E. coli</i> TG1	<i>E. coli</i> TG1	<i>E. coli</i> NovaBlue	<i>E. coli</i> NovaBlue
Plásmido de expresión	pET-32a (+)	pIVEX2.4c	pGEX-KG- HBD-3	pET-32a(+)	pET-32a (+)	pET-32a (+)	pET-32a (+)
Cepa de expresión	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Sistema libre de células	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)
Proteína de fusión	No	trxA de pET32; GFP de pBluescript-GFP	GST	TrxA	TrxA	TrxA	TrxA
Promotor	T7/Lac	T7	Lac	T7/Lac	T7/Lac	T7/Lac	T7/Lac
Condiciones de cultivo	37°C, 200 rpm; 0.6 OD	30°C, 300 rpm, 3h	Up to 0.3 - 0.5 OD	32°C, 250 rpm 0.4 OD	37°C; 9 OD	32°C; 220 rpm 10 OD	32°C; 10 D.O
Inductor	0.6 mM IPTG	ND	0.5 mM IPTG	0.5 mM IPTG	0.4 mM IPTG	0.4 mM IPTG	0,4 mM IPTG
Tiempo de expresión	4h	ND	ND	6h	6h	4h	4h
Temperatura de inducción	37°C	ND	ND	ND	34°C	ND	4 h; 32°C
Rendimiento	1g/L proteína total 23% HBD3	trx-HBD-3: 390 trx-HBD-4: 385 GFP-HBD-3: 310 GFP-HBD-4: 320 μ g/ml	ND	trx-HBD-3: 0.99; trx-HBD-4: 0.09 g/L	0.689 g/L	0.38 g HBD5/L; 0.36 g HBD6/L	0,31 g/L HBD26; 0,31 g/L HBD27
Etiqueta de histidinas	Sí	Si	No	Sí	Si (entre Trx y hBD4)	Si (entre Trx y hBD)	Sí
Proteína	Cuerpos de inclusión	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble
Datos de plegamiento	No	No	No	No	No	No	No
Actividad biológica	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 (0.19 g/mL); <i>E. coli</i> ATCC 25922 >25	No	<i>S. aureus</i> (ATCC25923) 12.5 μ g/ml	<i>E. coli</i> K12D31	<i>E. coli</i> K12 D31, <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E. coli</i> K12	<i>E. coli</i> K12, <i>S. aureus</i> , y <i>S. cerevisiae</i>
Medio de cultivo	LB (crecimiento) y Medio cerebro corazón para antimicrobiano	Kit para expresión en sistemas libre de células	LB	LB y MBL (Fermentador)	LB, MBL: expresión, M-H (antimicrob)	LB, MBL: expresión, M-H (antimicrob)	LB, MBL: expresión, M-H (antimicrob)
Referencia	Song <i>et al.</i> 2009	Chen <i>et al.</i> 2007	Li-gang <i>et al.</i> 2007	Huang L <i>et al.</i> 2006	Xu <i>et al.</i> 2006	Huang <i>et al.</i> 2008	Huang <i>et al.</i> 2009

ND. No Descrito

2.4 Mecanismos de acción antimicrobiana

A nivel molecular el modo de acción de las β -defensinas aún no ha sido revelado y sería interesante explorar si las defensinas de diferentes órdenes de eucariotes también poseen similitudes en su modo de acción antimicrobiano^{12,28}. A pesar de las limitaciones para la comprensión del mecanismo de acción antibacteriano, se ha propuesto que las defensinas afectan los organismos susceptibles, irrumpiendo en los elementos estructurales de sus membranas celulares^{2,47}. Este es considerado como su mecanismo de acción primario y que requieren dos cualidades presentes en los péptidos antimicrobianos: su naturaleza catiónica que les permite interactuar con los grupos aniónicos de la membrana microbiana^{1,23} y su naturaleza no polar que les permite integrarse en el interior de dicha membrana^{9,23}. Los sitios de acople sobre la superficie bacteriana, incluyen lipopolisacáridos en bacterias Gram (-), ácidos lipo-teicoicos en bacterias Gram (+) y los fosfolípidos aniónicos de membrana en ambos tipos de bacterias (fosfatidil glicerol y cardiolipina)^{16,20,23,48}. La base de la discriminación de los CAMP en cuanto a su acción, parece estar relacionada con la composición lipídica de las membranas y generalmente que estén libres de colesterol^{3,11}. Este es el motivo por el que las membranas celulares de eucariotes son más resistentes al mecanismo de los CAMP^{11,16}. Sin embargo no pueden excluirse otros mecanismos antimicrobianos, como son, la posible inducción de enzimas autocatalíticas en la célula microbiana o los posibles blancos intracelulares una vez que la permeabilización celular se ha logrado².

La evaluación estructural de los péptidos antimicrobianos, ha mostrado tendencias generales, pero poca identidad en sus secuencias, esto sugiere que cada péptido ha evolucionado, para que pueda actuar de manera óptima en el ambiente en el que es liberado⁴⁷. Así los grupos estructurales sean una constante en los diferentes péptidos (hojas β -, estabilizadas por puentes disulfuro, α -hélices anfipáticas), la carencia de identidad en la secuencia, dificulta la predicción de la actividad de los péptidos *in vivo* y hace aún más difícil, diseñar un péptido sintético con potencial actividad antibacteriana¹¹. Para el diseño de un péptido se pueden tener en cuenta ciertos criterios como son, su naturaleza catiónica (que promueve la interacción con el exterior de la bacteria y con la membrana citoplasmática) y la hidrofobicidad, puesto que se posibilita la unión del péptido a la membrana del microorganismo, por la interacción entre las cadenas acil-lípidos de las bacterias y el núcleo helicoidal hidrofóbico del péptido¹¹.

3. JUSTIFICACIÓN

- Puesto que la HBD3 tiene un amplio espectro de acción antimicrobiano sobre bacterias tanto Gram (-) como Gram (+), presumiblemente debido a la gran cantidad de cargas positivas, y considerando que HBD2 tiene un espectro de acción limitado principalmente sobre bacterias Gram (-), deseamos determinar si el incremento en cargas positivas en la HBD2, aumentaría su espectro de acción sobre bacterias Gram (+). El incremento en el número de cargas positivas de la HBD2 se realizará con base a la comparación con estructura primaria de la HBD3.
- En nuestro grupo de trabajo existe interés en lograr la expresión y plegamiento de proteínas ricas en puentes disulfuro. Hasta el momento tenemos experiencia en las neurotoxinas de arácnidos que poseen motivos estructurales estabilizados por puentes disulfuro y que son del tipo α/β o ICK (Inhibidor de los nudos de cisteína, por sus siglas en inglés). Por tanto la expresión y plegamiento de las β -defensinas humanas heterólogas con un “andamiaje estructural” similar debido a la presencia de los puentes disulfuro, se convierte en una posibilidad para el entendimiento de las características de tales tipos de proteínas.
- Es de gran interés evaluar la capacidad de las β -defensinas producidas heterológamente en su actividad antimicrobiana sobre *Mycobacterium tuberculosis*.

4. HIPÓTESIS

- El incremento en la carga catiónica de la β -defensina-2, dará como resultado un aumento en la actividad antimicrobiana sobre bacterias Gram (+) y una mayor capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos de interés clínico, cuando se compara con la defensina parental.
- Es posible llegar a expresar y obtener cantidades representativas de péptidos recombinantes de bajo peso molecular (como HBD2, HBD3 y HBD2 modificadas), sin la presencia de proteínas de fusión como coadyuvantes en el proceso de expresión.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivos generales

- Incrementar la carga positiva de la HBD2 para establecer su actividad antimicrobiana comparada con la HBD2 parental.
- Establecer las condiciones para la producción de HBD2, HBD2 modificadas y HBD3 recombinantes y comparar su actividad biológica en cuanto a su capacidad antimicrobiana.

5.2 Objetivos específicos

- Diseñar y construir los genes de las β -defensina humanas 2, 3 recombinantes.
- Generar variantes de las defensinas mediante mutagénesis sitio dirigida.
- Establecer métodos para expresión, plegamiento y purificación de β -defensina humana 2, β -defensina humana 3 y β -defensinas humanas modificadas.
- Caracterizar la actividad antimicrobiana de la β -defensina humana 2, β -defensina humana 3 y β -defensinas humanas 2 modificadas, sobre microorganismos patógenos de interés clínico.

6. MÉTODOS

6.1 Materiales

- Cepas de clonación: *E. coli* DH5 α (F^- , *endA1*, *glnV44*, *thi-1*, *recA1*, *relA1*, *gyrA96*, *deoR*, *nupG*, *lacZ* Δ M15, *hsdR17*). *E. coli* XL1-Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI^qZ* Δ M15 Tn10 (Tetr)]).
- Cepas de Expresión: *E. coli* M15[(pREP4)] (*Nal^r*, *Str^s*, *Rif^s*, *Tbi^r*, *Lac^r*, *Ara⁺*, *Gal⁺*, *Mit⁺*, *F⁻*, *RecA⁺*, *Uvr⁺*, *Lon⁺*) ésta cepa contiene un plásmido que confiere resistencia a kanamicina; *E. coli* BL21 DE3 (F^- , *ompT*, *gal*, *dcm*, *lon*, *hsdS_B*($r_B^- m_B^-$), λ (DE3 [*lacI*, *lacUV5-T7*])) o en C41 DE3 ($F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal, dcm$ (DE3)).
- Cepas para ensayos antimicrobianos: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Compradas directamente de American Type Culture Collection por medio de The Global Bioresource Center™ por la UNAM.
- Enzimas: *Bam*HI, *Pst*I, *Eco*RV, *Msc*I, *Hind*III, *Bgl*II *Nco*I, Vent Polimerasa, Taq polimerasa (New England Biolabs-NEB); T4 ADN Ligasa, (Fermentas); Factor Xa (NEB); Lisozima (Muramidasa aislada a partir de la clara de huevo de gallina - Roche).
- Vectores: pBluescript KS(+) (pKS) (promotor *lac*, resistencia ampicilina) (Stratagene); pQE30 (promotor T5/*lac*, resistencia ampicilina) (QiaGen); pQE40 (promotor ; resistencia ampicilina; contiene proteína de fusión Dihidroxi folato reductasa o DHFR) (QiaGen); pET22b(+) (promotor T7; resistencia ampicilina; contiene péptido señal que envía las proteínas expresadas a periplasma) (Novagen); pET28a(+) (promotor T7; resistencia kanamicina) (Novagen) y pET32(a) (promotor T7; resistencia ampicilina; plásmido que contiene la proteína de fusión tioredoxina o Trx) (Novagen).
- Medios de cultivo: 2xYT (17 g triptona; 10 g extracto de levadura; 5 g cloruro de sodio; agua destilada hasta 1 L); Caldo Tripticasa soya (TSB, Fluka); 7H9 (Becton-Dickinson); Medio RPMI 1640 (Cambrex).
- Reactivos: isopropil-1-tio- β -galactopiranosido (IPTG) (Fermentas); 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-GAL) (Sigma); Bromuro de Cianógeno (CNBr) (Sigma), Tricina; Cloruro de Guanidinio (GndHCl) (Sigma); 3,3-tetrahidrocloruro de diaminobenzidina (DAB) (Sigma); 1,4-Ditiotreitol (DTT) (Sigma); agarosa de baja electro-endosmosis (L-EEO) (IBI Scientific); Resazurina (Sigma); Suero fetal bovino (FBS) (Gibco).
- *Kits*: purificación de ADN a partir de agarosa, QIAquick™ (Qiagen); purificación de plásmidos High Pure Plasmid Isolation (Roche); Resina y columna para cromatografía de afinidad a níquel (*ion-metal affinity chromatography* (IMAC) con ácido Ni-nitrilo triacético (Ni-NTA)) (QiaGen).

6.2 Diseño de oligonucleótidos para el ensamblaje de los genes de HBD2 y HBD3

Para el diseño de los genes de las β -defensinas se utilizaron como base las secuencias aminoacídicas depositadas en la base de datos, Protein Data Bank (PDB), identificadas con las claves 1FD3 y 1KJ6 para HBD2 y HBD3, respectivamente (Tabla 5).

Tabla 5. Secuencias de residuos de aminoácidos de las β -defensinas 2 y 3

	PDB	Secuencia de residuos de aminoácidos
HBD2	1FD3	GGIGDPVTCLKSGAICHVPVFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKKP
HBD3	1KJ6	GGIINTLQKYCYRVRGGRCVLSCLPKEEQIGKCTRGRKCCRKK

Por medio de una traducción reversa de las secuencias de aminoácidos, se obtiene la secuencia de ADN de cada uno de los genes, que fueron optimizadas considerando el uso preferencial de codones para la bacteria hospedera *E. coli*⁴⁹. Se diseñaron entonces cuatro oligonucleótidos sintéticos sobrelapantes para cada uno de los genes HBD2 y HBD3 (Tabla 6). Adicional al gen de cada β -defensina, se ubicaron en el extremo 5' los sitios de reconocimiento para la enzima restricción *Bam*HI y para la proteasa Factor Xa (Ile-Glu-Gly-Arg); y en el extremo 3' se ubicaron dos codones de paro, seguidos por el sitio de reconocimiento para la enzima restricción *Pst*I. Éstas construcciones se diseñaron considerando ser clonadas en el vector de expresión pQE30.

Tabla 6. Secuencias de los oligonucleótidos sobrelapantes para los genes de las β -defensina 2 y β -defensina 3.

	Nombre Oligonucleótido	SECUENCIAS DEL OLIGONUCLEÓTIDOS SINTÉTICOS (5' → 3')
HBD2	Up1-H2	GAGGATCCATCGAGGGGAAGGGGTATTGGCGATCCGGTTACCTGTCTGAAAAGCGG (55 nt)
	Lw2-H2	CGACGCGGACAAAACACTGGATGGCAGATTGCACCGCTTTTCAGACAGGTAACC (54 nt)
	Up3-H2	CAGTGTTTTGTCCGCGTCGCTATAAGCAGATTGGCACCTGCGGTCTGCCTGG (52 nt)
	Lw4-H2	TCCTGCAGTTATTACGGTTTCTTGCAACATTTGGTGCCAGGCAGACCGCAGGTG (54 nt)
HBD3	Up1-H3	GAGGATCCATCGAGGGGAAGGGGCATTATCAATACGCTGCAGAAATACTATTGCCGGGT (58 nt)
	Lw2-H3	TCGGTAAACAGCTCAGAACTGCACAACGACCTCCTCTCACCCGGCAATAGTATTCTG (58 nt)
	Up3-H3	CAGTTCTGAGCTGTTTACCGAAAAGAGGAACAAATAGGCAAGTGCAGTACCCGC (53 nt)
	Lw4-H3	TCCTGCAGCTATTATTCTTGCGACGACAGCATTACGACCGGGTACTGCACTTGC (58 nt)

Los oligonucleótidos purificados en gel de poliacrilamida (15 %) con urea (8 M) se empalmaron por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), donde la secuencias sobrelapantes entre los oligonucleótidos Up1-Lw2, Up3-Lw4 y Lw2-Up3, permitieron la amplificación hasta obtener el gen completo y de doble cadena de HBD2 y HBD3. Las concentraciones de los reactivos usados para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) fueron: 10 pico-moles/ μ L de cada uno de los oligonucleótidos Up1

y Lw4; 5 pico-moles/ μL de los cada uno de los oligonucleótidos Lw2 y Up3; 0.2 mM dNTPs; 1X *Buffer* de la polimerasa; 5 U de Vent polimerasa (New England Biolabs). La mezcla de PCR se sometió a 30 ciclos de desnaturalización (30 s, 95 °C), hibridación (1 min, 55 °C) y elongación (30 s, 75 °C). Finalmente y teniendo los genes ya ensamblados, se procede a realizar la clonación.

6.3 Clonación de los genes ensamblados

Cada gen obtenido por amplificación en la reacción de PCR se purificó de gel preparativo de agarosa (1.2 %), usando el *kit* de extracción de ADN, QIAquick™. Para llevar a cabo el proceso de ligación, se utilizó como vector de clonación el plásmido pKS cortado previamente con la enzima de restricción *EcoRV*, que lineariza el vector dejando extremos romos. Para 20 μL de reacción de ligación, se usaron 5 U de la enzima T4 ADN Ligasa, 1X del *Buffer* T4 ADN Ligasa, y una mezcla conformada por el inserto y el vector linearizado, en una relación molar de 5 a 1, respectivamente. La reacción se realizó a 16 °C durante 16 horas. Pasado el tiempo de incubación, 5 μL de la reacción de ligación se utilizaron para transformar células hospederas de mantenimiento *E. coli* DH5 α o *E. coli* XL1-Blue (quimiocompetentes). Las transformaciones se incubaron en medio sólido 2xYT con ampicilina 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IPTG y 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de X-GAL, a 37°C durante 16 horas. El sistema de selección de colonias blanco/azul del plásmido pKS, permitió elegir 14 colonias blancas que se evaluaron por PCR de colonia, utilizando Taq polimerasa y los oligonucleótidos T7-like (GCGTAATACGACTCACTATA) y T3-like (CTCACTAAAGGGAACAAAAGC). Condiciones del PCR de colonia: 0.2 mM de dNTPs; 0.4 pmol/ μL de oligonucleótido directo; 0.4 pmol/ μL de oligonucleótido reverso; 1X de *Buffer* de polimerasa; 5 U de Vent Polimerasa; una colonia disuelta en 5 μL de agua. Cuatro colonias con el tamaño de inserto esperado se pusieron a crecer en 5 mL de medio líquido 2xYT con 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina. Luego de 16 horas de incubación se purificaron los plásmidos por *kit* de purificación y posteriormente se secuenció el ADN plasmídico, utilizando los mismos oligonucleótidos antes mencionados. Finalmente se obtuvieron las construcciones llamadas pKS::HBD2 y pKS::HBD3 (se indica el plásmido y la construcción que éste lleva).

6.4 Diseño para la clonación de los genes de las β -defensina en los vectores de expresión

Se diseñaron diferentes oligonucleótidos que permitieran generar otras construcciones dirigidas específicamente a ciertos vectores de expresión (Tabla 7). En dichas construcciones están presentes: sitios de restricción en los extremos 5' y 3', la secuencia que codifica para el factor de corte por la proteasa Factor Xa o un codón AUG que codifica para metionina (corte con CNBr), la secuencia que codifica para la etiqueta de histidinas, y los codones de paro. Los diferentes diseños pudieron además ser ensamblados a partir de los moldes de secuencia comprobada pKS::HBD2 y pKS::HBD3.

Tabla 7. Construcciones de los vectores de expresión

Vector	Detalles para la construcción del vector (5' → 3')
pQE30	<i>Bam</i> HI + Factor Xa + Gen HBD + Codones de Paro + <i>Pst</i> I
pQE30	<i>Bam</i> HI + Met + Gen HBD + Codones de Paro + <i>Pst</i> I
pQE40	<i>Bgl</i> II + Factor Xa + Gen HBD + Codones de Paro + <i>Pst</i> I
pET22b(+)	<i>Bam</i> HI + His Tag + Factor Xa + Gen HBD + Codones de Paro + <i>Hind</i> III
pET28a(+)	<i>Bam</i> HI + Factor Xa + Gen HBD + Codones de Paro + <i>Hind</i> III
pET32(a)	<i>Msc</i> I + His Tag + Factor Xa + Gen HBD + Codones de Paro + <i>Hind</i> III

Éstas construcciones se amplificaron por PCR con oligonucleótido directos o codificantes y reversos o complementarios, que eran particulares para cada uno de los vectores de expresión (Tabla 8): pQE40, pET22b(+) y pET32(a). Las construcciones en pET28a(+) se lograron a partir de los genes obtenidos de los plásmidos pQE30::HBD2 y pQE30::HBD3, utilizando las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III. Posteriormente se purificaba el producto de restricción a partir de gel de agarosa y finalmente se sometía cada gen a reacción de ligación con el plásmido pET28a(+), previamente digerido con las mismas enzimas de restricción.

Tabla 8. Oligonucleótidos directo (F) y reverso (R) para construcciones de los vectores de expresión

Plásmido	HBD	Oligonucleótidos (5' → 3')
pQE40	HBD2	F GGAAGATCTATCGAGGGACGCGGTATTGGTGATCCGGTTACCTGTCIG
		R GTCCTGCAGCTATTACGGTTTTTTACAACATTGGT
	HBD3	F GGAAGATCTATCGAGGGACGCGGCATTATCAATACGCTGCAAAAATAC
		R GTCCTGCAGCTATTATTCTTGGCAGCAGCATT
pET32(a)	HBD2	F GGATGGCCATCACCATCATCATCATATCGAGGG
		R CCCAAGCTTCTATTACGGTTTCTTGCAACATTGGT
	HBD3	F GGATGGCCATCACCATCATCATCATATCGAGGG
		R CCCAAGCTTCTATTATTCTTGGCAGCAGCATT
pET22b(+)	HBD2	F TGGGATCCTCACCATCATCATCATATCGAGGGACGCGGTATTGGCGATCCG GTTACCTGTC
		R CCCAAGCTTCTATTACGGTTTCTTGCAACATTGGT
	HBD3	F TGGGATCCTCACCATCATCATCATATCGAGGGACGCGGCATTATCAATACG CTGCAAAAATAC
		R CCCAAGCTTCTATTATTCTTGGCAGCAGCATT

F: oligonucleótido directo

R: oligonucleótido reverso

Para la amplificación por PCR se usaron, como templado, las secuencias correctas de pKS::HBD2 y pKS::HBD3, y los oligonucleótidos directo y reverso según el plásmido de

expresión adecuado para la clonación. Las condiciones de la reacción fueron: 50 ng del plásmido templado; 0.2 mM de dNTPs; 0.4 pmol/ μ L de oligonucleótido directo; 0.4 pmol/ μ L de oligonucleótido reverso; 1X de *Buffer* de polimerasa; 5 U de Vent Polimerasa. La mezcla de PCR se sometió a 30 ciclos de desnaturalización (30 s 95 °C), hibridación (entre 30 s y 1:30 min a 55 °C, según la longitud del inserto) y elongación (30 s 75 °C). Al lograr la amplificación por PCR de la nueva construcción, se purificó utilizando gel de agarosa (1.2 %) y se hizo ligación de cada inserto en el plásmido de clonación pKS y al igual que en el procedimiento anterior (apartado 6.3) se evaluó cada colonia por PCR y por secuenciación.

6.5 Construcción de vectores de expresión

A partir de los vectores de clonación construidos y secuenciados, se procedió a digerir el gen de HBD2 o HBD3, usando las enzimas de restricción (New England Biolabs) correspondientes a cada uno de los vectores de expresión:

- *Bam*HI y *Pst*I para el vector pQE30
- *Bgl*II y *Pst*I para el vector pQE40
- *Bam*HI y *Hind*III para el vector pET22b(+)
- *Msc*I y *Hind*III para el vector pET32(a)
- *Bam*HI y *Hind*III para el vector pET28a(+)

Tanto los plásmidos de clonación que contenían el inserto, como los vectores de expresión, fueron digeridos con las mismas enzimas de restricción, de manera que se obtuvieran extremos congruentes entre plásmidos e insertos que luego pudieran ser ligados.

Se realizó la sub-clonación de los insertos (HBD2 o HBD3) purificados por gel de agarosa (1.2 %), en el vector de expresión digerido. Las ligaciones dieron como resultados las construcciones para expresión pQE30::HBD2 y pQE30::HBD3; pQE40::HBD2 y pQE40::HBD3; pET22::HBD2 y pET22::HBD3; pET32::HBD2 y pET32::HBD3; pET28::HBD2. Cada uno de los productos de la reacción de ligación se transformó en células quimiocompetentes *E. coli* XL1-Blue. Algunas de las clonas se evaluaron por PCR de colonia y aquellas que mostraran un tamaño de inserto similar al esperado fueron puestas a crecer para obtener plásmido y finalmente se verificaron por secuenciación desde ambos extremos del inserto para confirmar tanto el marco de lectura como la conservación de los sitios de restricción. Se utilizaron los oligonucleótidos indicados en la Tabla 9.

Tabla 9. Oligonucleótidos para secuenciación de vectores de expresión

Vector	Oligonucleótido Directo (5' → 3')	Oligonucleótido Reverso (5' → 3')
pQE	GAGCGGATAACAATTATAA (pQE-F)	GGTCATTACTGGATCTAT (pQE-R)
pET	AGATCTCGATCCCGC (pET-F)	GACCCGTTTAGAGGC (pET-R)

Las evaluaciones de identidad se llevaron a cabo en todas las construcciones usando el

programa BLASTx (NCBI), para confirmar la exactitud de sus estructuras primarias.

6.6 Expresión heteróloga de las β -defensinas 2 y 3

Para evaluar la expresión de las defensinas, las cepas hospederas *E. coli* BL21 DE3, C41 DE3 o *E. coli* M15[pREP4], fueron transformada con los vectores de expresión, siguiendo el procedimiento mencionado a continuación: una clona de una transformación reciente, se utilizó para inocular 5 mL de medio 2xYT más el antibiótico correspondiente. Este cultivo, llamado pre-inóculo se incubó durante 16 horas a 37 °C y 180 rpm. Un mililitro del pre-inóculo se adiciona a 25 mL de medio 2xYT más antibiótico, éste es el inóculo que se incubó por 2 horas a 37 °C y 180 rpm. El inóculo se adiciona a 500 mL de medio 2xYT más antibiótico y se incubó (37 °C y 180 rpm) hasta alcanzar una densidad óptica de 1.3 U, momento en que se hace la inducción del cultivo con IPTG y se adiciona nuevamente el antibiótico. Las condiciones de la inducción son: 0.1 mM de IPTG, durante 4 horas, 20 °C y 180 rpm para pET28a(+); y 1 mM de IPTG, durante 8 horas, 29 °C y 180 rpm para pQE30. En cuanto al antibiótico se usa con dependencia del sistema de expresión usado así: para expresiones en pET28a(+) se usaron 30 μ g/mL de kanamicina y para expresiones en pE30 se usaron 200 μ g/mL de ampicilina y 30 μ g/mL de kanamicina.

El cultivo inducido se incubó entre 4 y 8 horas. Luego las células fueron concentradas por centrifugación a 7,000 g durante 15 minutos y 4 °C en una centrífuga Beckman Coulter Avanti J-30I (Beckman Coulter). El botón celular resultante se resuspendió en *Buffer* Tris-HCl 0.05 M pH 8.0 y se adicionó 0.1 volumen de lisozima (1 mg/mL), dejando en incubación por 30 minutos en hielo. Se continuó con un proceso físico de ruptura celular utilizando un sonicador. Las fracciones solubles e insolubles se separaron por centrifugación (7,000 g durante 60 minutos). En éste punto se efectuaron determinaciones para establecer la fracción celular en el que podría encontrarse la proteína expresada, por medio de geles poliacrilamida de Tricina - dodecil sulfato de sodio (Tricina-SDS-PAGE) (gel separador 15 / gel concentrador 4 %) con tinción de Coomassie Brilliant blue. También se realizaron análisis de inmuno-*blot*, en el que las muestras se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Protran BA 85 0.45 μ m, Whatman) en un equipo *Semi-Dry Blotter* (Scientific Co.) a una corriente de intensidad constante de 0.65 mA/cm² de membrana y usando *Buffer* de transferencia (48 mM Tris-HCl; 39 mM Glicina; 0,037 % SDS; 20 % Metanol; y agua destilada hasta 1 litro), durante 45 minutos. La membrana se bloqueó con 1% de BSA en *Buffer* Tris salino-Tween (TBST: 150 mM NaCl; 50 mM Tris base pH 7.5; agua destilada hasta 1 L; 0.1% Tween 20) durante la noche. Posteriormente, la membrana se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución del anticuerpo monoclonal de ratón Anti-His₆-Peroxidasa (1:10,000 v/v) (Roche) en TBST. Al final de la incubación la membrana fue lavada y la detección de las proteínas recombinantes que presentaran la etiqueta de histidinas, se hizo con solución de revelado (10 mL de la solución: 6 mg DAB (3,3'-diaminobezidina, Sigma); 0.03 % [w/v] de cloruro de níquel; 10 μ L peróxido de hidrógeno al 30 %; 50 mM Tris-HCl (pH 7.5); 150 mM cloruro de sodio).

6.7 Tratamiento de la proteína expresada en fracción soluble y en cuerpos de inclusión

A partir de los procesos químicos y físicos de ruptura celular, se llegan a obtener las fracciones soluble (sobrenadante) e insoluble (precipitado) producto de la expresión. La fracción que contenga el péptido expresado fue tratada de la siguiente manera: se resuspende en *Buffer* de solubilización (6M GndHCl; 0.05 M Tris-HCl pH 8.0), se incuba durante 2 horas y se centrifuga a 7,000 *g* durante 40 minutos. Las proteínas heterólogas presentes en el sobrenadante de la solución de solubilización, se purifican mediante columna de afinidad IMAC-NiNTA, cuyo principio es la interacción entre las histidinas del péptido expresado con cationes divalente como el níquel, en dos de sus seis puntos de coordinación. Posteriormente las proteínas se eluyen de la resina con *Buffer* de elución (6M GndHCl; 0.05 M Tris-HCl que contiene además 0.4 M imidazol, pH 8,0). Las muestras obtenidas fueron sujetas a análisis por electroforesis de proteínas de Tricina-SDS-PAGE (15 %) e inmuno-*blot*.

6.8 Purificación de péptidos heterólogos

Las muestras obtenidas a partir de la columna de níquel, se sometieron a reacciones de reducción con 0.1 mM de DTT que se incubaron a 55°C durante 1 hora y luego se purificaron por HPLC-RP (Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa). La muestra se pasó por una columna semipreparativa C₁₈ de fase reversa (Cosmosil C₁₈, 5µm, 120 Å, 10 x 250 mm) usando el solvente A (0.12% de Ácido Tri-Fluoracético -TFA- en agua) y el solvente B (0.1% de TFA en acetonitrilo); con un gradiente de 20 a 60% de solvente B en 40 minutos y con un flujo de 2 mL/min. La proteína recombinante se purificó posteriormente usando una columna analítica (Vydac C₁₈ o C₄: 5µm, 300 Å, 4.6 x 250 mm), con el mismo gradiente, aunque el flujo de 1 mL/min. Los productos de la purificación se liofilizaron, se almacenaron a -20°C y se reservaron para los diferentes análisis. Las masas moleculares de las defensinas heterólogas se confirmaron por espectrometría de masas (ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS), LCQ Fleet Ion Trap, Thermo Scientific). La concentración de cada uno de los péptidos se determinó por absorbancia a una longitud de onda de 280 nm y usando sus respectivos coeficientes de extinción teóricos.

6.9 Plegamiento de los péptidos

Los péptidos purificados y con masa molecular correcta, se sometieron a proceso de plegamiento *in vitro* bajo condiciones controladas, usando 2 M de GndCl en *Buffer* Tris-HCl 0.05 M pH 8.0, 1 mM de glutatión reducido (GSH) y 0.1 M de glutatión oxidado (GSSH). Posteriormente se purificaron en RP-HPLC en iguales condiciones a las mencionadas en el apartado anterior. Las fracciones obtenidas se evaluaron en sus masas por ESI-MS.

6.10 Cambios en el gen de HBD2

Considerando los inconvenientes para lograr la expresión del gen de HBD2, se plantearon estrategias que pudieran conducir a la obtención de la proteína recombinante. La primera de las estrategias fue aumentar el tamaño del gen, insertando 12 nucleótidos que codifican para los aminoácidos GGSG, ubicados antes del sitio de corte del factor Xa y que en caso de expresarse no introducirían cambio alguno en el péptido HBD2. Para lograr la construcción se utilizó el oligonucleótido directo p30-GS-HBD2 (Tabla 10) que contenía la inserción, el oligonucleótido reverso Lw4-H2 (Tablas 6 y 10) y como templado la construcción corroborada pQE30::HBD2. Se siguieron los procesos de clonación y subclonación, descritas anteriormente, hasta obtener construcción pQE30::GS-HBD2.

Tabla 10. Oligonucleótidos usados para realizar cambios en HBD2

Nombre de la Construcción	Oligonucleótido Directo (5' → 3')	Oligonucleótido Reverso (5' → 3')
pQE30:: GS-HBD2	GAGGATCCGGCGGTAGCGG	TCCTGCAGTTATTACGGTTTCTT
	CATCGAGGGAAGGGGTATT	GCAACATTTGGTGCCAGGCAGA
	GGCG (Oligonucleótido p30-G-HBD2)	CCGCAGGTG (Oligonucleótido Lw4-H2)

Otras construcciones que dieron origen a los diferentes cambios en el gen HBD2, se hicieron siguiendo la técnica de mutagénesis sitio dirigida por PCR, en la que primero se amplifica un megaprimer que se construye con un oligonucleótido directo, un oligonucleótido reverso interno y un templado. Luego de purificar el megaprimer se realiza una segunda reacción de amplificación en la que se tiene un oligonucleótido directo que es el megaprimer, un oligonucleótido reverso y un templado. Esta última amplificación da como resultado el gen que se usa para hacer los procesos de clonación y subclonación hasta obtener las construcciones finales.

Se obtienen las siguientes construcciones en las que se introducen aminoácidos principalmente en la región α -hélice del péptido HBD2, logrando así mayor semejanza con la secuencia de HBD3: pQE30::HBD2-KLK, pQE30::HBD2-KL, pQE30::HBD2-K, pQE30::KLK-HBD2, pQE30::GS-HBD2-KLK (Figura 3).

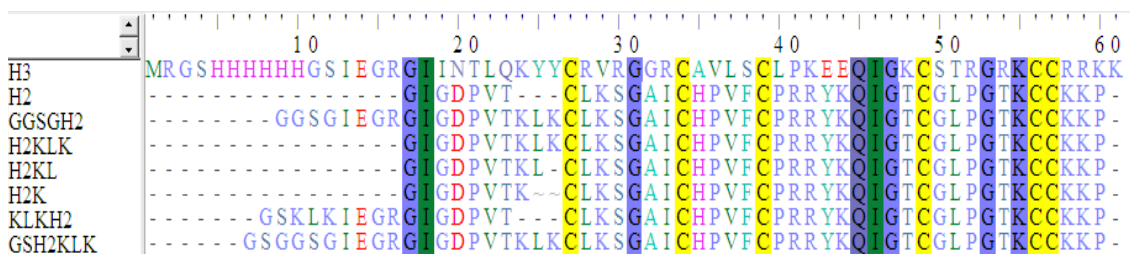


Figura 3. Alineamiento de secuencias de residuos de aminoácidos de las diferentes mutantes de HBD2

Como templado para éstas construcciones se utilizó el plásmido de secuencia confirmada pQE30::HBD2 y los oligonucleótidos directo y reverso interno que están indicados para

cada construcción en la Tabla 11. La amplificación final para cada una de las construcciones, se hizo utilizando el megaprimer particular ya obtenido y el oligonucleótido reverso universal R-p30 (Tabla 11).

Tabla 11. Oligonucleótidos usados para la generación de los megaprimers

Nombre de la Construcción	Oligonucleótidos para construcción de Megaprimers	
	Oligonucleótido Directo (5' → 3')	Oligonucleótido Reverso Interno (5' → 3')
pQE30::HBD2-KLK	CACGGATCCATCGAGGGAC GCGGTATTGGC	CGCTTTTCAGACACTTCAGTTTG GTAACCGG (Oligonucleótido interno)
pQE30::HBD2-KL	GGATCGCATCACCATCACCA TCAC	GGCCAATGGTTTGACACAGACT TTTCGC (Oligonucleótido interno)
pQE30::HBD2-K	GGATCGCATCACCATCACCA TCAC	GGCCAATGGTTTACAGACTTTT CGC (Oligonucleótido interno)
pQE30:: KLK-HBD2	GAGGATCCAAACTGAAGATC GAGGG	GCTCAGCTAATTAAGCTTGGCT GCAG (Oligonucleótido interno)
pQE30:: GS-HBD2-KLK	GAGGATCCGGCGGTAGCGG CATCGAGGGAAGGGGTATT GGCG	CGCTTTTCAGACACTTCAGTTTG GTAACCGG (Oligonucleótido interno)
Oligonucleótidos Universales para pQE30	GGATCGCATCACCATCACCA TCAC (Oligonucleótido Directo Universal F-p30)	GCTCAGCTAATTAAGCTTGGCT GCAG (Oligonucleótido Reverso Universal R-p30)

6.11 Construcción de la β -defensina en tándem HBD3 y HBD2

Se planteó la construcción en tándem de HBD3 unida con HBD2 por medio de la secuencia flexible de aminoácidos GGGGM. La idea inicial era poder obtener la expresión de HBD2 mediante un péptido acarreador o de fusión que en éste caso sería HBD3. La construcción se diseñó para ser expresada en el vector pQE30 y quedaría de la siguiente manera:

MRGSHHHHHHGSIEGRMGIIINTLQKYYCRVRGGRCVLSCLPKEEQIGKCSTR
GRKCCRRKKGGGGMGIGDPVTCLKSGAICHPVFCPRRYKQIGTCGLPGTKCK
KP

La construcción tiene 108 residuos de aminoácidos y una masa molecular teórica de 11,822 Da, cuenta con dos metioninas (M) que permitirán hacer la separación de los péptidos usando el reactivo CNBr. La unión entre la defensinas se hace por medio de cuatro glicinas (GGGG) que en principio no confieren rigidez a la estructura, ni cargas o polaridad alguna. La construcción sigue presentado la etiqueta de histidinas al inicio de las secuencias que

permitirá hacer la purificación por columna de afinidad de níquel. También podría llegar a esperarse mayor toxicidad del dímero hacia el hospedero puesto que estaría expresando dos péptidos antimicrobianos, pero si se lograba expresar probablemente se iría a cuerpos de inclusión y se evitaría la toxicidad. También se pensó que el dímero podía tener mayor actividad antimicrobiana. Para la construcción se partió de los plásmidos pQE30::HBD3-M y pQE30::HBD2, ambos con secuencias confirmadas. La estrategia fue la siguiente:

- Amplificar HBD3-M utilizando el oligonucleótido directo Fp30 (oligonucleótido universal directo, Tabla 11). Como oligonucleótido reverso se utilizó una nueva construcción de 15 nucleótidos complementarios con la parte final de la secuencia de HBD3, más 15 nucleótidos que codifiquen para las 4 glicinas y la metionina. Es importante eliminar los sitios de paro y el sitio de corte *PstI* de HBD3. Oligonucleótido reverso 3-M-2 con dirección 5' – 3': ACCCATGCCTCCACCGCCTTTCTTGCGACGACAG.
- Amplificar HBD2-R utilizando como oligonucleótido reverso Rp30 (oligonucleótido universal Reverso, Tabla 11) y como oligonucleótido directo una nueva construcción que tenga 15 nucleótidos que codifican para 4 glicinas y la metionina más 15 nucleótidos complementarios al inicio de la secuencia de HBD2. Es importante eliminar el sitio de restricción para reconocimiento de la enzima *BamHI*. Oligonucleótido reverso 2-M-3 con dirección 5' – 3': GGCGGTGGAGGCATGGGTATTGGCGATCCGG.
- Luego de las amplificaciones anteriores, llamadas megaprimers, se purificaron los productos de PCR a partir de gel de agarosa (1.2 %) y se hizo una nueva amplificación utilizando los megaprimers de HBD3 y HBD2 y los oligonucleótidos Fp30 y Rp30 (oligonucleótidos universales).
- La construcción completa se clonó en el vector pGEM, que se sometió a secuenciación.
- El tándem de secuencia corroborada se aisló por restricción en los sitios *BamHI* y *PstI* y finalmente se clonó en el plásmido de expresión pQE30, en donde se corroboró la secuencia.

6.12 Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de las HBDs se determinó por ensayos de difusión en agar⁵⁰, concentración mínima inhibitoria (CMI) en medio líquido y la determinación de IC₅₀. Las determinaciones de la actividad antimicrobiana por ensayos de difusión en medio sólido, se iniciaron con un pre-inóculo de cada una de las bacterias patógenas, que se incubaron en medio TSB durante 18 h, 37 °C y 180 rpm. Cuando el cultivo estaba en la mitad de su fase logarítmica (0.5 de la escala de McFarland), se tomaron 50 µL del pre-inóculo y se inocularon 50 mL de medio TSB fresco. Pasadas 2.5 horas de incubación a 37 °C y en agitación, el cultivo se centrifugó a 900 g durante 10 min. Las células se lavaron dos veces con 15 mL de *Buffer* fosfato de sodio 10 mM (NaPB) pH 7.4; se centrifugaron nuevamente y se resuspendieron en 10 ml del mismo *Buffer* frío. Se determinó la densidad óptica (D.O.) del cultivo a una longitud de onda de 620 nm, utilizando como blanco NaPB. A partir de la relación que indica que una D.O. de 0.2 contiene 5x10⁷ UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonias/mL), se tomó el volumen que contuviera 1x10⁶ CFU y se mezcló con 10 mL

de medio 1 tibio (10 mM NaPB, 0.03 % w/v de TSB en polvo, 1 % w/v agarosa L-EEO y 0.02 % v/v Tween 20). La mezcla se vertió en cajas Petri (15 x 100 mm) situadas en una plataforma nivelada de manera que se formara una capa de aproximadamente 1 mm de profundidad. Cuando solidificara el medio se hicieron 7 pozos espaciados con un diámetro cada uno de 3 mm y se adicionaron en ellos 5 μ L de cada una de la HBDs en diferentes concentraciones, además de un control negativo (NaPB 5 μ L) y otro positivo (ampicilina 5 μ g/pozo). Las cajas fueron incubadas por 3 h a 37 °C. Luego del tiempo de incubación se cubrieron con 10 mL de medio 2 (TSB en doble concentración (6 % w/v) y 1 % w/v agarosa L-EEO). Después de 18-24 h de incubación, se midió el diámetro de la zona clara que estuviera alrededor de los pozos y que indicaba la inhibición del crecimiento bacteriano.

La Concentración mínima Inhibitoria o CMI, se define como la menor concentración de péptido que impide el crecimiento microbiano después de una incubación de 12 horas a 37 °C. Para su determinación en líquido se hizo en platos de ELISA (96 pozos) y siguiendo un procedimiento semejante al indicado para los ensayos de difusión en placa, excepto por la presencia de la agarosa en los medios 1 y 2.

La IC₅₀, es la concentración de péptido que inhibe el 50% del crecimiento de la bacteria. Los valores fueron determinados a partir del grado de inhibición calculado como la relación entre la absorbancia de las bacterias en presencia y en ausencia del péptido, durante 240 minutos y de acuerdo con la fórmula %I= $(1-(A^P/A^0)) \times 100$. Donde A⁰ es la intensidad de absorción en ausencia del péptido a 240 minutos y A^P es la intensidad de absorción en la presencia de la una concentración de péptido dada en el mismo tiempo⁵¹. Los datos de inhibición del crecimiento fueron obtenidos a partir de experimentos semejantes a los descritos para la determinación de CMI, haciendo mediciones cada 60 minutos durante 4 horas.

6.13 Actividad anti-*Mycobacterium tuberculosis*

La susceptibilidad del bacilo *Mycobacterium tuberculosis* bajo la acción de las defensinas heterólogas, se determinó por el ensayo de resazurina (REMA – por sus siglas en inglés –) usando el método en placa. La resazurina es un indicador de procesos de óxido-reducción y se ha usado para evaluar la viabilidad de microorganismos, determinación de la presencia de contaminaciones bacterianas y test de actividad antimicrobiana⁵². Para la realización de los experimentos se usaron las cepas de *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) y el aislado clínico resistente a medicamentos (MDR). El método REMA en placa se llevó a cabo utilizando medio 7H9 suplementado con 10 % de OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa). La resazurina (en polvo) se preparó al 10 % (w/v) en agua destilada y se esterilizó por filtración (0.22 μ m). Para este ensayo se partió de péptidos secos de HBDs y previamente cuantificados que fueron resuspendidos en medio 7H9-OADC. En cada uno de los pozos de la placa de ELISA se depositó el volumen correspondiente al doble de la concentración del péptido que deseaba evaluarse y luego se completaba el volumen hasta 100 μ L con medio 7H9-OADC. Las concentraciones evaluadas para las HBDs estaban

comprendidas un rango entre 96.2 y 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El inóculo de *M. tuberculosis* se preparó a partir de un cultivo en fase logarítmica de 14 días, que luego fue ajustado con medio 7H9-OADC a una concentración según la escala de Mcfarland de 1.0 (0.76 OD, 600nm) y de donde se hicieron diluciones de 1:20. A cada uno de los pozos que ya contenían los péptidos en diferentes concentraciones se adicionaron 100 μL del inóculo de *M. tuberculosis*, obteniéndose un volumen final de 200 μL . Rifampicina y etambutol se usaron como controles positivos, el medio 7H9-OADC como control negativo y medio 7H9-OADC sin adición de inóculo como control de esterilidad. Las placas se cubrieron y se incubaron a 37 °C en atmósfera normal. Después de 5 días de incubación, se adicionaron 20 μL de la solución de resazurina a los pozos que contenían los controles y se incubaron por 24 h a 37°C. Si se llegaba a observar un desarrollo de color como era el esperado (rosa para control de crecimiento de microorganismos y color azul para el control de esterilidad), se adicionaban 20 μL de la solución de resazurina a los pozos que contenían las defensinas en las diferentes concentraciones. Después de 24 h de incubación, un cambio de color de azul a rosa indicó reducción de la resazurina y por ende el crecimiento del microorganismo. La concentración mínima inhibitoria, CMI, se definió como la menor concentración de péptido que inhibió el cambio de color. Los experimentos se realizaron por triplicado.

6.14 Actividad hemolítica

La actividad hemolítica o citotóxica de las defensinas heterólogas, se evaluó sobre eritrocitos humanos, obtenidos a partir de muestras de sangre de un donador sano, quien dio su consentimiento previo. Los eritrocitos fueron concentrados por centrifugación (800 g) y luego se eliminó todo el suero con cuatro lavados usando *Buffer* fosfato salino (PBS) 5 mM pH 7.4. Los eritrocitos concentrados y limpios se resuspendieron en PBS y su concentración se ajustó a 10^7 UFC/mL. Un volumen de 200 μL de dicha suspensión se incubó en presencia de cada una de las HBD en concentraciones que iban de 2.5 a 50 μM , durante 60 min y a 37 °C. Pasado el tiempo de la incubación, las suspensiones se centrifugaron 5 min a 1,000 g . La absorbancia del sobrenadante se determinó a una longitud de onda de 595 nm. Como control positivo se utilizaron eritrocitos incubados con una solución al 10% de Triton X-100, que generaba una lisis considerada como el 100 % de la hemólisis; mientras que eritrocitos incubados con PBS (pH 7.4) sirvió como control negativo. También fue usado como control positivo el péptido hemolítico y antimicrobiano, Pin 2 del veneno del escorpión africano *Pandinus imperator*⁵³. Todos los experimentos fueron realizados en triplicado.

6.15 Actividad quimiotáctica

La capacidad quimiotáctica de las defensinas recombinantes se evaluó sobre células THP-1 (ATCC TIB-202), línea celular proveniente de leucemia aguda monocítica humana. El crecimiento y mantenimiento de las células THP-1 se realizó en frascos para cultivo celular (25 cm^2 , Corning) que contenían el medio Roswell Park Memorial Institute o RPMI, suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS) (Gibco-Life Technologies). Las

células se cultivaron a 37 °C con 100 % de humedad y 5 % de CO₂ y de las que se efectuaron subcultivos cada dos días. El ensayo se realizó en la cámara de Boyden de 48 pozos (Neuro Probe, Inc.) y se determinó la migración (quimiotaxis) de las células THP-1 a través de una membrana de policarbonato libre de polivinil pirrolidona (PVP-free) con poro de 5 μm de diámetro. Para el ensayo 2x10⁶ células/mL se marcaron con 10 μM de calceína-AM fluorescente (BD Biosciences) durante 30 minutos⁵⁴. En breve el ensayo se realizó de la siguiente manera: los pozos de la parte inferior de la cámara de Boyden se llenaron con 27 μL del péptido disuelto en el medio RPMI y en diferentes concentraciones (50, 100, 250, 500 y 1000 nM); cada muestra se evaluó por triplicado. Como control de quimioatracción, se utilizaron 27 μL de *N*-formil-methionil-leucil-phenilalanina o fMLP (Sigma, St. Louis, MO) (triplicado). Como control negativo se utilizaron 27 μL de medio RPMI (por triplicado). Posteriormente se posicionó una membrana de policarbonato PVP-free sobre la parte inferior de la cámara que contenía las muestras y los controles. A continuación se ubicaron un empaque y finalmente la parte superior de la cámara que se ajustó firmemente con los seguros de la cámara. En este punto del proceso se adicionaron al compartimiento superior de la cámara, las células THP1 previamente tratadas con calceína-AM (2x10⁵ células en 50 μL). La cámara se incubó en oscuridad durante 2 horas a 37 °C con 100 % de humedad y 5 % de CO₂. Al final de la incubación la membrana se retiró y las células que estuvieran en la parte superior de la membrana se removieron con lavados de NaPB pH 7.4. Cuando la membrana estuvo totalmente seca, se determinó la fluorescencia de la calceína el equipo FluorChem 8800 Imaging System (Alpha Innotech, San Leandro, Ca, U.S.A.) en el que la longitud de onda de la excitación se estableció a 485 nm y la longitud de onda de la emisión se estableció a 520 nm. La mayor intensidad de fluorescencia indicaba la migración de las células por efecto de la presencia de las defensinas recombinantes.

6.16 Corte de péptidos con bromuro de cianógeno

Las defensinas heterólogas HBD3-M y HBD3-M-HBD2 fueron sometidas al proceso de corte químico por medio de CNBr. Los péptidos maduros de las defensinas humanas heterólogas, están precedidos por un segmento de 16 aminoácidos que puede ser retirado por medio de un corte en el carbono terminal de la metionina, que está ubicada inmediatamente antes del péptido. Con el corte también puede lograrse la separación de las defensinas presentes en el tándem. El proceso se lleva a cabo resuspendiendo las HBDs en una solución de 50 mg/mL de CNBr en 70 % de ácido fórmico de manera que se logre la relación de 1 μg de proteína por 1 μg de CNBr⁵⁵. La reacción se deja incubando en oscuridad y temperatura ambiente. Terminada la reacción, el CNBr se desplaza de la mezcla inyectando N_{2(g)} suavemente hasta que se logre secar todo, se adiciona agua y se realiza nuevamente el desplazamiento del líquido con N_{2(g)}, se repite el proceso en total 3 veces. Finalmente, la muestra se resuspende en agua con TFA y se purifica por RP-HPLC.

6.17 Tratamiento estadístico

Se realizaron los análisis One-way ANOVA y test de *Tukey*, para examinar la varianza, de manera que pudiera demostrarse si las medias de dos o más muestras eran iguales cuando eran comparadas dos o más condiciones. Los software Origin 8® (OriginLab Corporation) y GraphPad Prisma® (GraphPad) se usaron para las determinaciones estadísticas. Los valores se consideraron significativos con $P > 0.05$. Los datos son mostrados como la media con su desviación estándar (\pm SD).

7. RESULTADOS Y DISCUSION

Como producto de los resultados de ésta tesis doctoral, se publicaron dos artículos científicos en revistas internacionales indexadas. El primero de ellos corresponde a una revisión acerca de la expresión heteróloga de β -defensinas (Corrales-García y cols., 2011) y el segundo es el reporte de los resultados obtenidos en ésta investigación (Corrales-García y cols., 2013). Ambos artículos están en el Anexo 4.

7.1 Diseño y ensamble de genes de las defensinas humanas 2 y 3

Teniendo como base la secuencia de aminoácidos obtenidas del PDB para las β -defensinas 2 y 3, se realizó una traducción reversa de las secuencias y se consideró el uso preferencial de codones para *E. coli*, para diseñar cuatro oligonucleótidos sintéticos para cada uno de los genes de las defensinas humanas (Tabla 6). Posteriormente los oligonucleótidos se sometieron a reacciones de armado por PCR hasta llegar a obtener los genes sintéticos. El diseño de los genes se hizo considerando que serían clonados en el plásmido de expresión pQE30. La construcción final de los genes se caracterizó por contar en el extremo 5' con la secuencia 5'-GAGGATCCATCGAGGGAAGG-3' (que lleva el sitio de restricción de la enzima *Bam*HI y el sitio de reconocimiento para el corte con el factor *Xa*) y en el extremo 3' tiene la secuencia 5'-TAATAGCTGCAGGA-3' que lleva dos codones de paro y el sitio de reconocimiento de la enzima *Pst*I. Teniendo en cuenta todas éstas consideraciones, y utilizando como ejemplo el procedimiento seguido para HBD3, se empalmaron por PCR los oligonucleótidos Up1-Lw2, oligonucleótidos Up3-Lw4, y oligonucleótidos Up1-Lw2-Up3-Lw4 en reacciones de PCR separadas (Figura 4) (condiciones de trabajo indicadas en el apartado 6.2). El tamaño de amplificado esperado corresponde al visualizado en el gel, que es para el producto del empalme de los oligonucleótidos Up1-Lw2 y Up3-Lw4 de 96 y 94 nucleótidos respectivamente, y para el gen completo de 169 nucleótidos. La banda con el tamaño esperado se purificó a partir del gel de agarosa, usando un *kit* de purificación y se obtuvo el gen listo para ser clonado (Figura 6). Finalmente se obtuvieron las secuencias nucleotídicas mostradas en la Tabla 12.

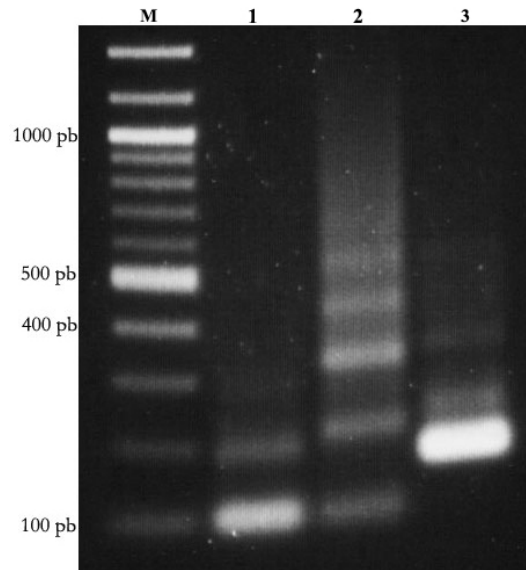


Figura 4. Amplificación de los oligonucleótidos para empalmar el gen HBD3. Líneas: M- marcador de pares de bases; 1- producto del empalme de los oligonucleótidos Up1-Lw2, 96 pares de bases; 2- producto del empalme de los oligonucleótidos Up3-Lw4, 94 pares de bases; 3- producto del empalme de los cuatro oligonucleótidos, 169 pares de bases. (Gel de agarosa 1%).

Tabla 12. Secuencias finales de las β -defensinas humanas 2 y 3.

Defensina	Secuencia (5' → 3')
HBD2	GA GGA TCC ATC GAG GGA AGG GGT ATT GGC GAT CCG GTT ACC TGT CTG AAA AGC GGT GCA ATC TGC CAT CCA GTG TTT TGT CCG CGT CGC TAT AAG CAG ATT GGC ACC TGC GGT CTG CCT GGC ACC AAA TGT TGC AAG AAA CCG TAA TAG CTG CAG GA (157 nt)
HBD3	GA GGA TCC ATC GAG GGA AGG GGC ATT ATC AAT ACG CTG CAG AAA TAC TAT TGC CGG GTG AGA GGA GGT CGT TGT GCA GTT CTG AGC TGT TTA CCG AAA GAG GAA CAA ATA GGC AAG TGC AGT ACC CGC GGT CGT AAA TGC TGT CGT CGC AAG AAA TAA TAG CTG CAG GA (169 nt)

7.2 Construcciones de vectores de clonación

Siguiendo el procedimiento descrito en los métodos (Apartado 6.3), se procedió luego a ligar los genes HBD2 y HBD3 (amplificados por PCR) con el plásmido pKS hasta obtener las construcciones pKS::HBD2 y pKS::HBD3, las cuales se utilizaron para transformar las células *E. coli* DH5 α . Las células transformadas se eligieron con base en los siguientes marcadores de selección del plásmido pKS: resistencia a ampicilina y expresión de la enzima β -galactosidasa (*lac Z*). La expresión de ésta enzima se detecta de manera indirecta por la formación de un precipitado azul intenso en presencia del sustrato cromogénico X-GAL. La ligación exitosa del gen HBD2 o HBD3 con el plásmido pKS, se da en la región del gen *lac Z*. De tal manera, la inserción del gen heterólogo provoca la irrupción de *lac Z* y se impide la formación del color en la bacteria. Posteriormente, de cada una de las

construcciones se tomaron 14 clones que no presentaron color azul cuando crecieron en la caja Petri (medio sólido 2xYT, ampicilina 200 µg/mL, 100 µg/mL de IPTG y 40 µg/µL de X-GAL) y se realizó PCR de colonia para determinar cuáles clones mostraban un amplificado de ADN del tamaño esperado. Los plásmidos purificados de aquellas clonas positivas en el PCR se verificaron por secuenciación usando oligonucleótidos T7-*like* y T3-*like* (secuencias indicadas en el apartado 6.3); al alinear se comprobó que se tenía la secuencia correcta (Figura 5). Los plásmidos recombinantes pKS::HBD2(pQE30) o pKS::HBD3(pQE30), purificados y secuenciados, se usaron para dos propósitos: como templado para la construcción de los otros vectores de clonación y de expresión, y para obtener los insertos de HBD2 y HBD3.

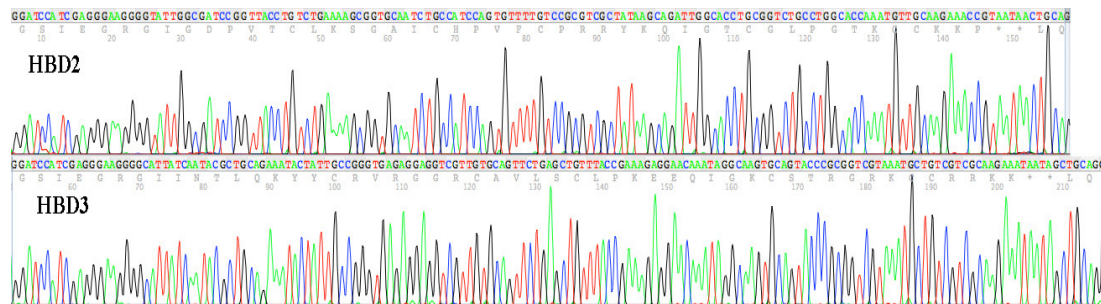


Figura 5. Electroferograma que muestra los resultados de secuenciación para plásmidos pKS::HBD2 y pKS::HBD3

Con posterioridad y tal como se indicó en el apartado 6.4 del apartado correspondiente a métodos, se efectuó el diseño de una serie de oligonucleótidos que permitieran hacer construcciones denominadas también insertos (Tabla 7), dirigidas a diferentes vectores de expresión. Para este proceso, se procedió a amplificar por PCR cada uno de dichos insertos, usando como primers los oligonucleótidos diseñados para cada uno de los vectores de expresión, como templado los plásmidos recombinantes pKS::HBD2(pQE30) o pKS::HBD3(pQE30), y las condiciones de reacción mencionadas en el apartado 6.4.

Luego de la amplificación por PCR se obtuvieron los insertos de ADN con el tamaño esperado según el marcador de peso molecular, para cada uno de los vectores de expresión (Figura 6).

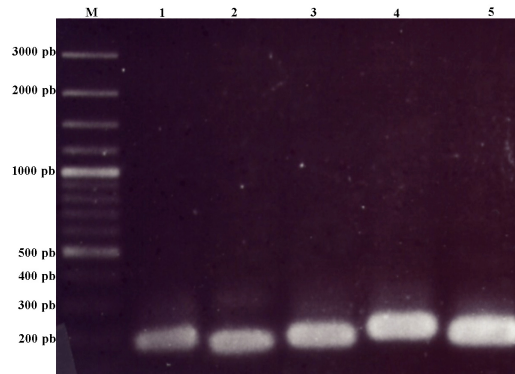


Figura 6. Genes construidos para diferentes vectores de expresión. Pozos: M. Marcador; 1. HBD2(pET32a); 2. HBD2(pQE40); 3. HBD3(pQE30); 4. HBD3(pET32a); 5. HBD3(pQE40).

De cada uno de los insertos se obtuvieron 100 µL de volumen de reacción de PCR, los cuales se purificaron por medio de gel preparativo de agarosa (1.2 %) y se sometieron a reacción de ligación con el plásmido de clonación pKS. Se obtuvieron las siguiente construcciones que fueron verificadas por secuenciación:

- pKS::HBD2(pQE40)
- pKS::HBD2(pET32a)
- pKS::HBD2(pET22b)
- pKS::HBD2(pET28a)
- pKS::HBD3(pQE40)
- pKS::HBD3(pET32a)
- pKS::HBD3(pET22b)

Cada uno de los plásmidos de clonación se sometió a reacción de restricción con las enzimas correspondientes; luego se obtuvieron los insertos purificados que se clonaron en su vector correspondiente de expresión. Cada uno de los plásmidos de expresión se sometió previamente a restricción con las mismas enzimas, de manera que los extremos tanto de insertos como de vectores fueran similares y se posibilitara la ligación entre ellos. Todas las construcciones fueron verificadas por secuenciación y a partir de ellos se hicieron los vectores de expresión.

7.3 Construcciones de vectores de expresión

Con los vectores de clonación de secuencia correcta se inició el proceso de la construcción de los vectores de expresión. Cada vector de clonación se digirió con las enzimas de restricción correspondientes según el diseño, al igual que el plásmido de expresión acarreador (Tabla 13). Los insertos obtenidos de cada reacción de restricción que mostraran el tamaño esperado, se purificaron y se usaron para la reacción de ligación con el vector de expresión linearizado. A continuación se realizó la transformación de células *E. coli* XL1-Blue quimiocompetentes y las clonas de cada transformación se evaluaron por PCR de colonia, usando oligonucleótidos para secuenciación de vectores de expresión (Tabla 9). Aquellas clonas que mostraran tamaño de inserto esperado se evaluaron por secuenciación y finalmente se obtuvieron los plásmidos recombinantes: pQE30::HBD2 y pQE30::HBD3; pQE40::HBD2 y pQE40::HBD3; pET22b::HBD2 y pET22b::HBD3; pET32a::HBD2 y pET32a::HBD3; pET28a::HBD2 (Tabla 13).

Tabla 13. Construcciones de vectores de expresión

Vector Clonación	Enzimas Restricción	Plásmido Expresión	Tamaño Insero (pb)	Vector Expresión
pKS::HBD2(pQE30)	<i>Bam</i> HI y <i>Pst</i> I	pQE30	153	pQE30::HBD2
pKS::HBD2(pQE40)	<i>Bgl</i> II y <i>Pst</i> I	pQE40	153	pQE40::HBD2
pKS::HBD2(pET32a)	<i>Msc</i> I y <i>Hind</i> III	pET32a	172	pET32a::HBD2
pKS::HBD2(pET22b)	<i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III	pET22b	172	pET22b::HBD2
pKS::HBD2(pET28a)	<i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III	pET28a	161	pET28a::HBD2
pKS::HBD3(pQE30)	<i>Bam</i> HI y <i>Pst</i> I	pQE30	165	pQE30::HBD3
pKS::HBD3(pQE40)	<i>Bgl</i> II y <i>Pst</i> I	pQE40	165	pQE40::HBD3
pKS::HBD3(pET32a)	<i>Msc</i> I y <i>Hind</i> III	pET32a	184	pET32a::HBD3
pKS::HBD3(pET22b)	<i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III	pET22b	184	pET22b::HBD3

Los vectores de expresión se corroboraron por secuenciación y se utilizaron para los subsiguientes ensayos de expresión, destinados a obtener los péptidos heterólogos de las β -defensinas humanas 2 y 3.

7.4 Construcción del tándem

La construcción en la que se obtuvo HBD3 unida a HBD2 por medio de una corta secuencia de aminoácidos (GGGGM), se llamó pQE30-HBD3-M-HBD2. El proceso de construcción comenzó con la obtención de dos megaprimers (MP1 y MP2) por medio de dos reacciones separadas de PCR; en la primera de ellas se utilizó pQE30-HBD3-M como templado, el oligonucleótido directo Fp30 (Tabla 11) y el oligonucleótido reverso 3-M-2 (apartado 6.12); en la segunda reacción se utilizó pQE30-HBD2 como templado, el oligonucleótido directo 2-M-3 (apartado 6.12) y el oligonucleótido reverso Rp30 (Tabla 11). Los megaprimers obtenidos después de las reacciones de PCR mostraron los tamaños esperados para cada uno de los diseños, 198 nucleótidos para MP1 y 170 nucleótidos para MP2 (Figura 7A).

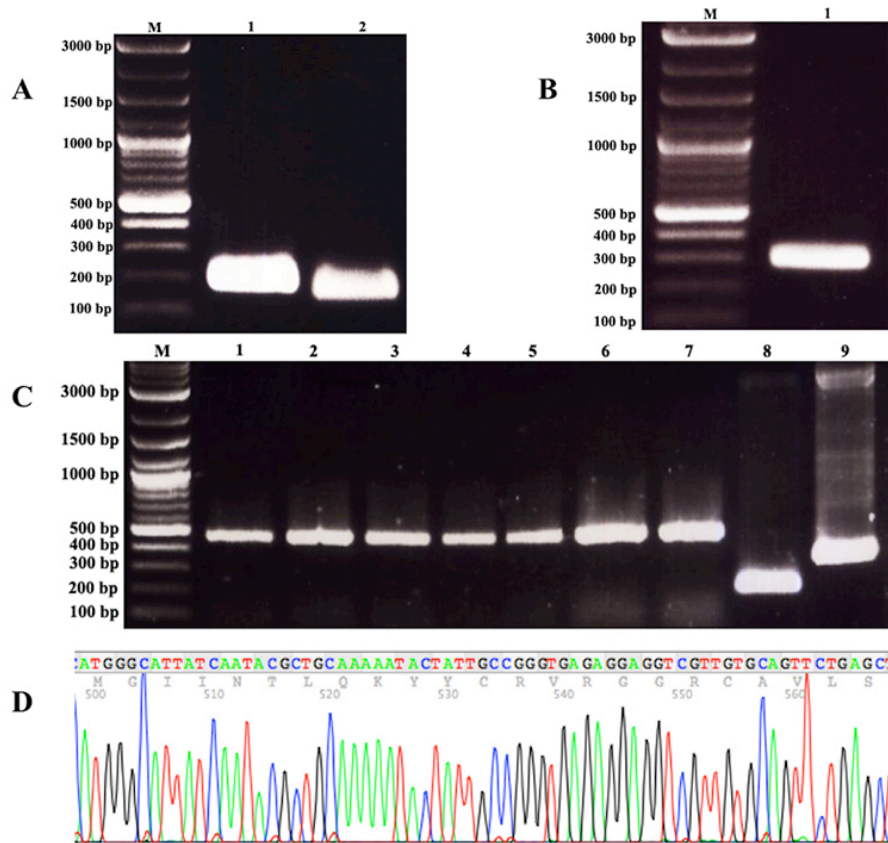


Figura 7. Construcción del gen que codifica para el Tándem de HBD3 y HBD2. A- Generación de los megaprimeres de HBD3 y HBD2. **B-** Amplificación del gen perteneciente al tándem HBD-M-HBD2. **C-** PCR de colonia que indica tamaños de insertos esperados en los pozos 1 a 7 (473 pb); control negativo en el pozo 8 con un tamaño de inserto que corresponde al plásmido vacío (200 pb); control positivo en el pozo 9, que indica un tamaño de inserto esperado de (310 pb). **D-** Espectro del secuenciación del tándem.

Luego de la purificación del ADN que codifica para cada uno de los megaprimeres, se realizó una tercera reacción de PCR en la que estaban presentes los oligonucleótidos, MP1, MP2, Fp30 y Rp30, de los que se esperaba lograr el empalme completo del gen y donde se obtuvo el tamaño esperado de 350 nucleótidos (Figura 7B). El gen completo y purificado a partir del gel de agarosa (1.2 %) se ligó en el plásmido pKS (previamente digerido con la enzima de restricción *EcoRV*) y posteriormente se transformó en la cepa *E. coli* DH5 α . La presencia de la nueva construcción se corroboró por secuenciación. A partir 500 ng del plásmido recombinante con secuencia correcta, se procedió a hacer restricción con las enzimas *Bam*HI y *Pst*I, de donde se obtuvo un inserto que correspondía al gen completo del tándem, que luego se ligó en el plásmido pQE30 digerido previamente con las mismas enzimas de restricción. El nuevo plásmido recombinante se transformó en la cepa *E. coli* DH5 α y después de 24 horas de crecimiento, 14 clonas se evaluaron por el método de PCR de colonia (oligonucleótidos pQE-F y pQE-R, Tabla 9) (Figura 7C). Cuatro clones que mostraron el tamaño esperado en la amplificación de 473 nucleótidos se enviaron a secuenciación para corroborar su secuencia (Figura 7D). Teniendo ya los plásmidos con secuencia correcta se procedió a realizar los ensayos de expresión del péptido heterólogo en tándem.

7.5 Expresión heteróloga y purificación de las β -defensinas humanas

Los plásmidos de expresión fueron transformados en células que permitieran producir la proteína recombinante: *E. coli* M15[pREP4], *E. coli* BL21 DE3, *E. coli* C41 DE3. La elección de célula a transformar se hizo con base en el promotor de cada uno de los plásmidos de expresión.

Es así como los plásmidos pQE30 y pQE40 (QiaGen) fueron transformados en la cepa *E. coli* M15 [pREP4]. Dichos plásmidos poseen el promotor T5/*lac*, que es regulado por la proteína represora Lac. Ésta regulación se la proporciona el plásmido pREP4, que es un vector de bajo número de copia, confiere resistencia a kanamicina y expresa constitutivamente la proteína del represor Lac (codificada por el gen *lac I*), dando así un control sobre el promotor que además puede ser inducido en presencia de IPTG.

Los plásmidos del tipo pET (Novagen) tienen promotor T7/*lac* y fueron transformados en células *E. coli* BL21 DE3 ó *E. coli* C41 DE3. Los plásmidos de la familia pET tienen el promotor del bacteriófago T7 que es reconocido por la ARN polimerasa del bacteriófago más no por la polimerasa de *E. coli*; por tanto no se obtendría expresión en la bacteria, de aquellos genes que estén bajo el control del promotor T7⁵⁶. Para lograr la expresión, las células hospederas deben tener el gen que codifica para la T7-ARN polimerasa (λ DE3 lisogénico) que a su vez están bajo control del promotor *lacUV5* a nivel del cromosoma de la bacteria hospedera y que sí permite la expresión en condiciones de inducción. Además del control proporcionado por el promotor *lacUV5*, los plásmidos de la familia pET también tienen un gen que codifica para el represor *lacI*, cuyo operador *lac* se encuentra inmediatamente después de la región promotora, confiriendo así un segundo mecanismo de control de la expresión.

Los diferentes plásmidos recombinantes transformados en la célula hospedera adecuada, fueron evaluados en condiciones de expresión, esperando que se generaran las proteínas de interés. En la Tabla 14 se muestra una relación entre tamaño de inserto, secuencia de aminoácidos y tamaño esperado de la proteína expresada.

Tabla 14. Construcciones de péptidos diseñados para ser expresados

Plásmido Recombinante	Proteína que se Expresa*	Tamaño Proteína (Da)
pQE30::HBD2	MRGSHHHHHHGS <u>IEGR</u> GIGDPVTCLKSGAICHVPFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKKP	6,188.2
pQE40::HBD2	MRGSHHHHHHGSIMVRPLNSIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFKYFQRM'TTTSSVEGKQNLVIMGRK'TWFSIPEKNRPLKDRINIVLSRELKEPPRGAHFLAKSLDDALRLIEQPELASKVDMVWIVGGSSVYQEA MNQPGHLRLFVTRIMQEFESD'TFFPEIDLGKYKLLPEYPGVLSEVQEEKGIKYKFEVYEKKGSR <u>IEGR</u> GIGDPVTCLKSGAICHVPFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKKP	28,202.0
pET32a::HBD2	MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSQQLKEFLDANLAGSGSGHHHHHHH <u>IEGR</u> GIGDPVTCLKSGAICHVPFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKKP	17,883.0
pET22b::HBD2	AMDIGINSDPHHHHHH <u>IEGR</u> GIGDPVTCLKSGAICHVPFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKKP	6,600.0
pET28a::HBD2	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRG <u>IEGR</u> GIGDPVTCLKSGAICHVPFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKKP	8,333.6/ 8,202.4 ‡
pET28a::HBD2-KLK	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRG <u>IEGR</u> GIGDPVTCLKCLKSGAICHVPFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKKP	8,703.1/ 8,571.9 ‡
pQE30::HBD3	MRGSHHHHHHGS <u>IEGR</u> GIINTLQKYYCRVGGRC AVLSCLPKEEQIGKCSTRGRKCCRRKK	7,015.2
pQE30::HBD3-M	MRGSHHHHHHGS <u>IEGR</u> MGIINTLQKYYCRVGGRC AVLSCLPKEEQIGKCSTRGRKCCRRKK	7,146.4
pQE40::HBD3	MRGSHHHHHHGSIMVRPLNSIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFKYFQRM'TTTSSVEGKQNLVIMGRK'TWFSIPEKNRPLKDRINIVLSRELKEPPRGAHFLAKSLDDALRLIEQPELASKVDMVWIVGGSSVYQEA MNQPGHLRLFVTRIMQEFESD'TFFPEIDLGKYKLLPEYPGVLSEVQEEKGIKYKFEVYEKKGSR <u>IEGR</u> GIINTLQKYYCRVGGRC AVLSCLPKEEQIGKCSTRGRKCCRRKK	29,029.0
pET32a::HBD3	MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSQQLKEFLDANLAGSGSGHHHHHHH <u>IEGR</u> GIINTLQKYYCRVGGRC AVLSCLPKEEQIGKCSTRGRKCCRRKK	18,710.0
pET22b::HBD3	AMDIGINSDPHHHHHH <u>IEGR</u> GIINTLQKYYCRVGGRC AVLSCLPKEEQIGKCSTRGRKCCRRKK	7,430.0
pQE30::HBD3-M-HBD2	MRGSHHHHHHGS <u>IEGR</u> MGIINTLQKYYCRVGGRC AVLSCLPKEEQIGKCSTRGRKCCRRKKGGGGMIGDPVTCLKSGAICHVPFCPRRYKQIGTCGLPGTKCCKKP	11,822.0

*Subrayado sencillo: péptidos maduros; Subrayado doble: sitio de corte de factor Xa (IEGR) o metionina (M)

‡ Procesamiento de la metionina inicial

7.5.1 Expresión y purificación de defensinas recombinantes en los plásmidos pQE40, pET32a(+) y pET22b(+)

Uno de los principales inconvenientes en el descubrimiento de medicamentos de naturaleza proteica, a partir de la información que ha generado el conocimiento del genoma humano, es llegar a generar suficientes cantidades de proteína soluble recombinante para su caracterización estructural y bioquímica⁵⁷. La eficacia de la producción de péptidos recombinantes en *E. coli*, está determinada por parámetros tales como cepa hospedera, uso preferencial de codones, vector de expresión, promotor, antibiótico de selección, estabilidad del ARNm, temperatura, medio de cultivo^{58,59}, entre otros, y las interacciones entre ellos hace aún mayor la complejidad en el momento de elegir los parámetros y sus niveles, que permitirán llegar a obtener mayor cantidad de proteína recombinante.

Algunas investigaciones reportan una serie de plásmidos de expresión para la obtención de las HBDs recombinantes (Tabla 4). A partir de dicha información se realizaron una serie de construcciones (Tabla 13 y 14) y ensayos de expresión que permitieron obtener algo de información para continuar con el proceso de obtención de las proteínas recombinantes en cantidades suficientes para llevar a cabo las diferentes pruebas biológicas. Los resultados de tales expresiones están expuestos en el Anexo 1 (apartados A.1.1 a A.1.3). En términos generales, se encontró que la expresión de HBD3 acoplada a la proteína de fusión DHFR del plásmido pQE40, estaba presente como cuerpos de inclusión y luego de todos los procesos de purificación, el rendimiento fue de 1.6 mg de proteína por litro de cultivo celular. Considerando que la HBD3 representa el 19.6 % de la proteína total, se recuperarían en teoría 0.32 mg/L de HBD3, sin tener en cuenta las pérdidas por corte y repurificación, por lo que se decidió no considerar ésta construcción como apta para los procesos subsiguientes de evaluaciones biológicas. En cuanto a HBD2, la expresión en el plásmido pQE40, no fue posible bajo ninguna de las condiciones evaluadas. Por otro lado, las expresiones en el plásmido pET32, llegaron a mostrar rendimientos de 3.2 mg/L y 2.5 mg/L para Trx-HBD3 y Trx-HBD2, respectivamente. Lamentablemente, los resultados obtenidos en los procesos de expresión y purificación de Trx-HBDs no fueron contundentes para continuar trabajando con este sistema de expresión. Por una parte su rendimiento en masa no fue tan elevado como otros reportes lo presentan^{31,60,61}, y el producto final obtenido es aún menor, considerando que el péptido maduro de cualquiera de las defensinas, representa únicamente el 20% del péptido total; Además, al momento de hacer la separación de la proteína de fusión Trx del péptido HBD, nos encontramos con que existe una degradación total de la HBD3 y un muy bajo rendimiento de HBD2. Otra de las pruebas realizadas fueron las construcciones en pET22b(+) de HBD2 y HBD3 que generaron cantidades muy bajas de proteína heteróloga, apenas detectable por *inmuno-blot*, por lo tanto no se consideró purificarlas o usarlas en ensayos biológicos. Finalmente, se concluyó que éstos vectores de expresión no permitirían obtener material suficiente para llevar a cabo los ensayos biológicos necesarios.

7.5.2 Obtención de HBD3, HBD3-M y el tándem HBD3-M-HBD2, expresados en el vector pQE30

Actualmente existen tres maneras de obtener CAMPs en concentraciones importantes para bioensayos, las cuales son a partir de las fuentes naturales^{13,20}, la síntesis química^{46,62} o por medio de estrategias de expresión recombinante^{25,63}. Las primeras dos formas de obtención de la molécula de interés tienen algunos inconvenientes, puesto que en las fuentes naturales los CAMPs se encuentran en cantidades limitadas y se tiene cierto grado de complejidad para lograr su purificación; y en cuanto a la síntesis química se habla de costos elevados en el momento de la producción de la molécula de interés. De manera que la expresión recombinante de CAMPs puede llegar a convertirse en una alternativa atractiva para producirlos. Además, existen diferentes metodologías que permiten realizar su purificación de manera sencilla y de relativo bajo costo.

Para dicho efecto, se utilizó el plásmido pQE30 (promotor T5/*lac*) con las construcciones HBD3, HBD3-M ó HBD3-M-HBD2, se expresaron en la cepa *E. coli* M15[pRep4] en medio 2xYT suplementado con 200 µg/mL de ampicilina y 30 µg/mL de kanamicina. Las células crecieron a 37 °C y 180 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 1.3 U (600 nm) y en éste punto se realizó la inducción con 1 mM de IPTG y se adicionó nuevamente ampicilina (200 µg/mL). El proceso de inducción se llevó a cabo durante 8 horas a 30 °C y 180 rpm. Al final del proceso las células se recolectaron y se sometieron a procesos de ruptura, hasta obtener las fracciones soluble e insoluble que se analizaron por geles de Tricina-SDS-PAGE (15 %). Tanto HBD3, HBD3-M como HBD3-M-HBD2 se encontraron en la fracción insoluble celular en forma de cuerpos de inclusión (Figuras 8-A, 9-A, 10-A). La presencia de las HBDs recombinantes se confirmaron por inmuno-*blot* (Figuras 8-B, 9-B, 10-B). Los cuerpos de inclusión se solubilizaron con GndHCl y la proteína de interés se separó del extracto celular por cromatografía de afinidad (IMAC-Ni-NTA) en varias fracciones de elución, que se sometieron a reducción y posteriormente se purificaron por RP-HPLC (C₁₈) (Figuras 8-C, 9-C, 10-C), hasta obtener el péptido puro, que se evaluó tanto por Tricine-SDS-PAGE como por inmuno-*blot* (Figuras 8-A-B, 9-A-B, 10-A-B, líneas 6 y 7). La determinación de la masa molecular del péptido puro en estado reducido fue de 7,015.4 (Figura 8-D) y 7,146.3 Da (Figura 9-D), para HBD3 y HBD3-M, respectivamente. Para HBD3-M-HBD2 la masa molecular oxidada fue de 11,810.0 kDa, puesto que no pudo detectarse en condiciones reducidas. Posiblemente la incapacidad de la determinación por espectrometría de masas fue consecuencia de la formación de agregados.

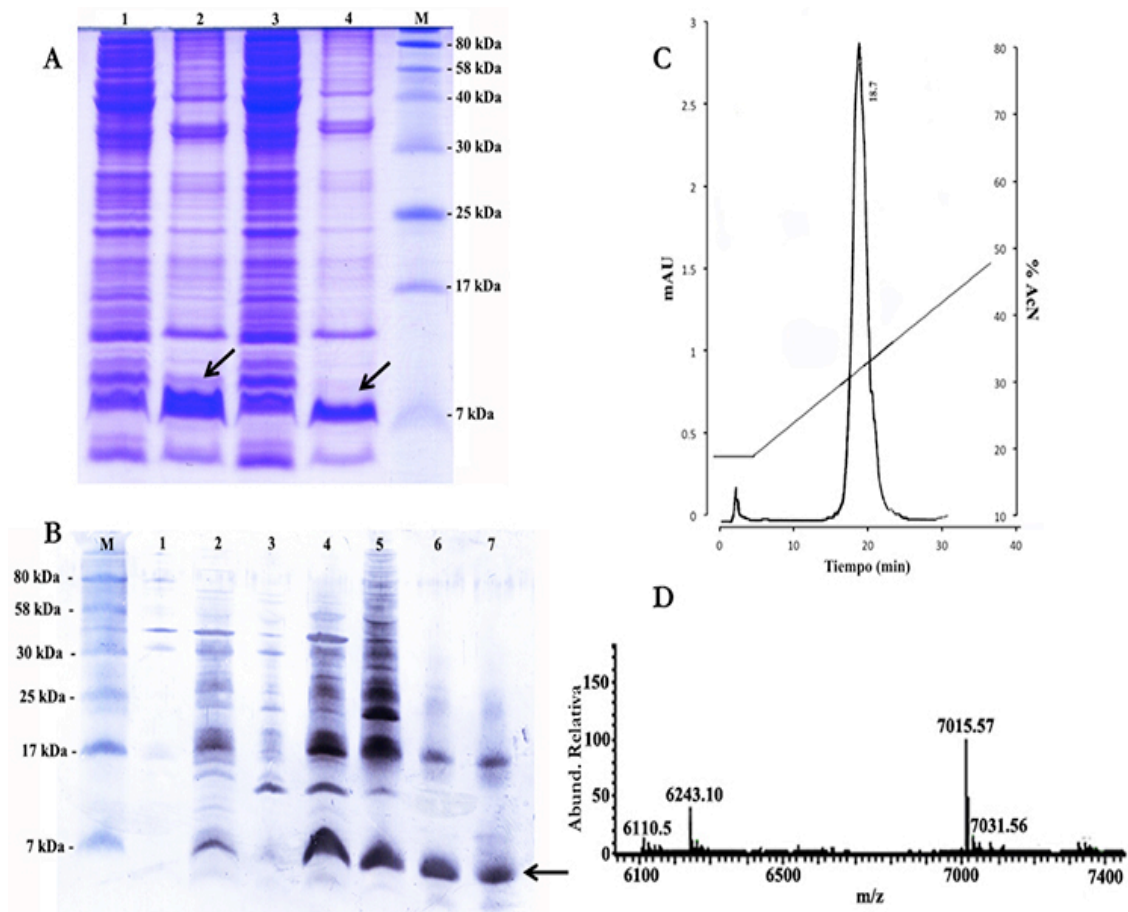


Figura 8. Obtención y purificación de HBD3 a partir del vector pQE30. (A) Gel de Tricina SDS-PAGE (15 %) luego de la tinción con Coomasie (20 μ g de proteína). Líneas: M- Marcador de peso molecular; 1- Células antes de inducción (20 μ g de proteína); 2- Células después de inducción (15 μ g de proteína); 3- Fracción soluble (20 μ g de proteína); 4- Fracción Insoluble (10 μ g de proteína). (B) Análisis de expresión por inmuno-*blot*; detección del péptido recombinante con el anticuerpo anti-His6 acoplado a peroxidasa (10 μ g de proteína total en las líneas 1 a 5 y 0.5 μ g en las líneas 6 y 7). Líneas: 1- Células antes de inducción; 2- Células después de inducción; 3- Fracción soluble; 4- Fracción Insoluble; 5- Purificación por IMAC-Ni-NTA; 6- Péptido luego de purificación por RP-HPLC semipreparativa; 7- Péptido luego de purificación por RP-HPLC analítica. (C) Cromatograma producto de la purificación RP-HPLC analítica de HBD3. Tiempo de retención 18.7 minutos correspondientes a 33.7% de AcN. (D) Análisis de espectrometría de masas de HBD3. Masa molecular esperada de 7,015.2 kDa y masa molecular experimental obtenida 7,015.6 kDa. Las flechas indican la presencia del péptido de interés.

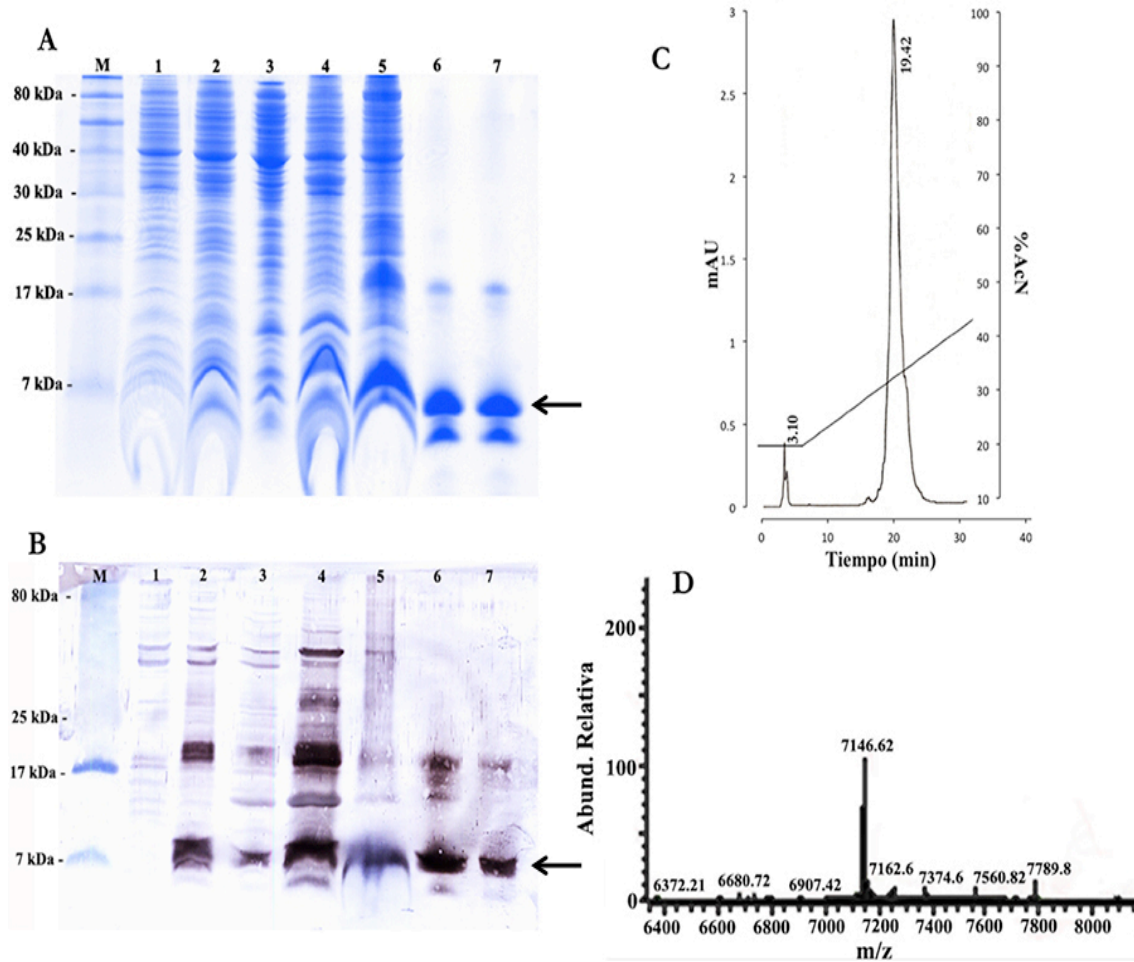


Figura 9. Obtención y purificación de HBD3-M a partir del vector pQE30. (A) Gel de Tricina SDS-PAGE (15 %) luego de la tinción con Coomassie. Líneas: M- Marcador de peso molecular; 1- Células antes de inducción (10 μ g de proteína); 2- Células después de inducción (15 μ g de proteína); 3- Fracción soluble (15 μ g de proteína); 4- Fracción Insoluble (15 μ g de proteína); 5- Purificación por IMAC-Ni-NTA (20 μ g de proteína); 6- Péptido luego de purificación por RP-HPLC semipreparativa (2 μ g de proteína); 7- Péptido luego de purificación por RP-HPLC analítica (2 μ g de proteína). (B) Análisis de expresión por inmuno-*blot*; detección del péptido recombinante con el anticuerpo anti-His6 acoplado a peroxidasa (10 μ g de proteína total en las líneas 1 a 5 y 0.5 μ g en las líneas 6 y 7). (C) Cromatograma producto de la purificación RP-HPLC analítica de HBD3-M. Tiempo de retención 19.4 minutos correspondientes a 34.4% de AcN. (D) Análisis de espectrometría de masas de HBD3. Masa molecular esperada de 7,146.4 kDa y masa molecular experimental obtenida 7,146.6 kDa. Las flechas indican la presencia del péptido de interés.

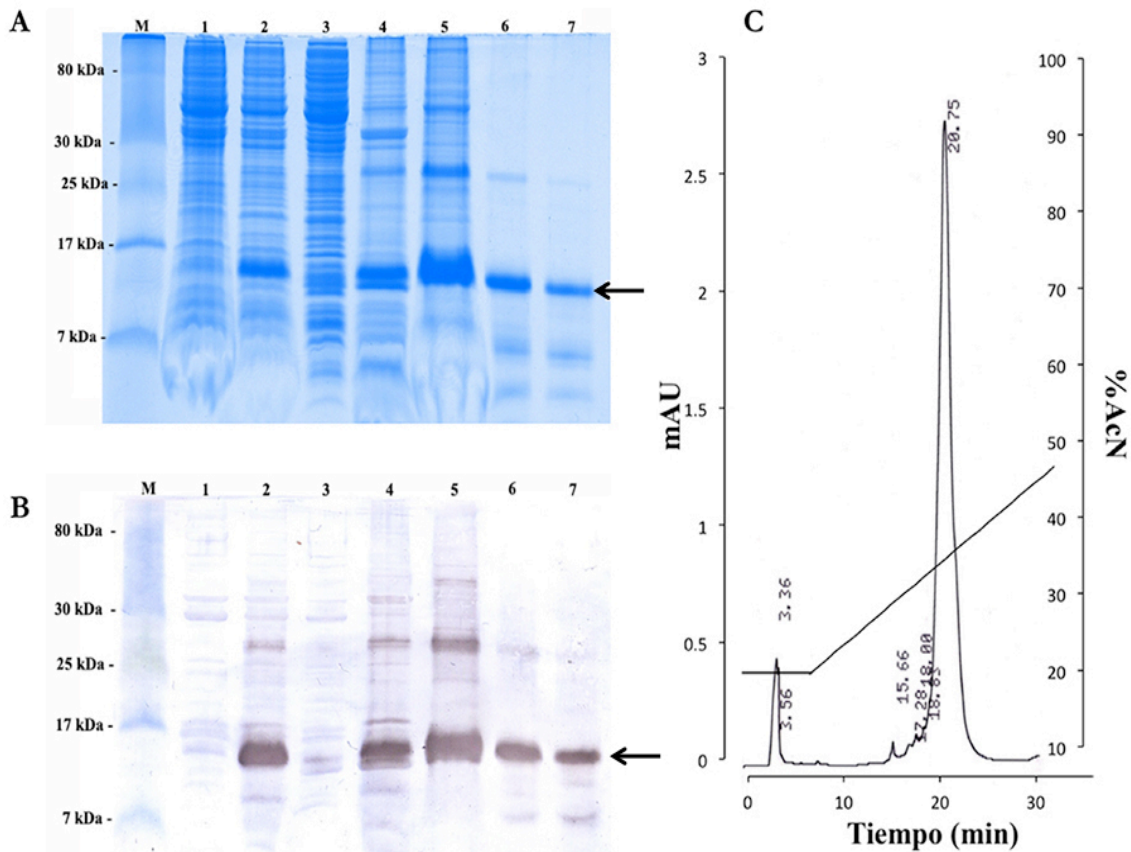


Figura 10. Obtención y purificación de HBD3-M-HBD2 a partir del vector pQE30. (A) Gel de Tricina SDS-PAGE (15 %) luego de la tinción con Coomassie (20 μ g de proteína total en las líneas 1 a 5 y 2 μ g en las líneas 6 y 7). Líneas: M- Marcador de peso molecular; 1- Células antes de inducción; 2- Células después de inducción; 3- Fracción soluble; 4- Fracción Insoluble; 5- Purificación por IMAC-Ni-NTA; 6- Péptido luego de purificación por RP-HPLC semipreparativa; 7- Péptido luego de purificación por RP-HPLC analítica. (B) Análisis de expresión por inmuno-*blot*; detección del péptido recombinante con el anticuerpo anti-His6 acoplado a peroxidasa (10 μ g de proteína total en las líneas 1 a 5 y 0.5 μ g en las líneas 6 y 7). (C) Cromatograma producto de la purificación RP-HPLC analítica de HBD3-M. Tiempo de retención 20.7 minutos correspondientes a 35.7% de AcN. Las flechas indican la presencia del péptido de interés. Las flechas indican la presencia del péptido de interés.

Los rendimientos de HBD3, HBD3-M y HBD3-M-HBD2 se determinaron en cada uno de los pasos de purificación (Tabla 17). La expresión de HBD3 y HBD3-M-HBD2 generaron 5 g/L de biomasa en peso húmedo, mientras que HBD3-M produjo 6 g/L. Después de los procesos de extracción y purificación de las HBDs, fue posible determinar en que paso podía generarse la mayor pérdida de producto. Es así como el rendimiento de HBD3, HBD3-M y HBD3-M-HBD2, se redujo después de la solubilización de los cuerpos de inclusión con el GndHCl y la purificación por la columna de afinidad de Ni, en donde se llegó a un rendimiento del 25, 22 y 11 % para los tres péptidos heterólogos, respectivamente. Pero la mayor reducción en el rendimiento se observa después del proceso de purificación por RP-HPLC, donde el rendimiento llega al orden de 4, 11 y 9.4% respectivamente (Tabla 17). Finalmente, los rendimientos para HBD3, HBD3-M y HBD3-M-HBD2 fueron 3.4, 9.5 y 5.5 mg/L, que corresponden a una recuperación aparente de 4.3, 10.9 y 9.4% respectivamente y con una pureza mínima del 90 % para todos ellos.

Analizando las cantidades obtenidas después los procesos de purificación por HPLC, semi-preparativa y analítica, puede deducirse que el segundo paso de purificación no es totalmente necesario (Figuras 8-A-B, 9-A-B, 10-A-B, líneas 6 y 7; Tabla 17).

La presencia de péptidos de fusión unidos a proteínas de interés se ha convertido en un método alternativo que permite obtener péptidos recombinantes con altos niveles de expresión, comodidad en la purificación, facilidad en la identificación por inmunoensayos, impedir la proteólisis del péptido de interés e inducir plegamiento, entre otras⁵⁵. Una de las formas de retirar el péptido de fusión que se encuentra en el extremo N-terminal de un péptido heterólogo maduro, es por medio del corte con la enzima llamada Factor de Coagulación Xa (Factor Xa), que es una serín proteasa de mamífero y que corta en la secuencia Ile-Glu(o Asp)-Gly-Arg↓, aunque el corte no se lleva a cabo si hay un residuo de prolina inmediatamente después de la arginina presente en la secuencia de corte⁵⁵. Otro de los lugares alternos de reconocimiento para el Factor Xa es el sitio Gly-Arg y en la medida en que esté presente, mayor será el reconocimiento inespecífico de la enzima por el péptido. En el caso de HBD3, se tienen además del sitio de reconocimiento específico para el Factor Xa, otros dos sitios secundarios que generaron en el momento del corte, una inespecificidad tal, que el péptido HBD3 no pudo ser encontrado. Ésta fue la razón por la que se hizo la adición de un residuo de metionina antes de la secuencia de HBD3, que permitiera ser cortada con CNBr.

Cuando se consideran las aplicaciones comerciales, el rendimiento de la proteína expresada se convierte en un factor de gran importancia. En éste trabajo los rendimientos de las HBDs humanas se consideran buenos si se llegan a comparar con otros reportes^{36,44}. La expresión de antimicrobianos de origen recombinante, pueden generar problemas que otros autores ya han reportado principalmente cuando se trata de expresión y obtención de péptidos pequeños, tales como la citotoxicidad hacia el hospedero, la susceptibilidad a la degradación del péptido heterólogo por enzimas proteolíticas y los bajos niveles de expresión debido al tamaño de la molécula (menos de 60 residuos de aminoácidos)⁶⁴⁻⁶⁸. Sin embargo es posible atenuar el impacto de todas éstas limitaciones en el rendimiento global. Algunos procedimientos se han propuesto para reducir esos efectos adversos, tales como el uso preferencial de codones, de manera que se mejore la expresión de proteínas en células que se hayan elegido para el proceso^{31,63,69}. Como ejemplo del impacto que puede llegar a generar la elección racional de la secuencia de ADN en el rendimiento de las expresiones heterólogas, algunos reportes demostraron el incremento de nueve veces la cantidad de HBD2 recombinante como resultado de la optimización del uso preferencial de codones cuando la defensina se expresó con tiorredoxina como proteína de fusión^{64,66,68}. Otra estrategia que puede llegar a utilizarse para lograr la expresión de péptidos potencialmente tóxicos para el hospedero es unirlos a una proteína de fusión^{31,39,42,70-76}. Se ha reportado que las proteínas acarreadoras pueden expresarse en grandes cantidades, sin generar efectos tóxicos para la célula y en ocasiones facilitan el plegamiento de las proteínas expresadas. Sin embargo es importante considerar que aunque se aumente la cantidad de proteína expresada, también se llega poner en riesgo tanto la actividad biológica de la proteína de interés como el rendimiento final que llega a obtenerse después de los procesos de cortes enzimáticos o químicos que permiten separarla de la proteína de fusión^{25,65,76,77}. Por otro

lado, también se ha documentado como el rendimiento de las proteínas recombinantes se ha aumentado significativamente en la medida en que va disminuyendo el tamaño de la proteína de fusión⁷⁸. Por lo tanto, es importante tener en cuenta un sistema de expresión que posibilite la obtención de los péptidos recombinantes a los que está unido solo una pequeña secuencia con un número limitado de residuos de aminoácidos que no interfieren con la actividad biológica del producto recombinante, como los obtenidos en éste trabajo.

Se ha propuesto que uno de los factores que contribuye a la capacidad de las HBDs de irrumpir las membranas bacterianas, es su efecto oligomerizante^{79,80}. Una carga neta positiva elevada en una molécula facilita dicha oligomerización o aún, en ocasiones un alto grado de multimerización. En ésta investigación se construyó, expresó y evaluó un ensamble en tándem de las defensinas HBD2 y HBD3, llamado HBD3-M-HBD2, que demostró una actividad antimicrobiana mayor comparada con sus componentes individuales (Tabla 18). La carga neta del tándem es de +18, que es considerablemente más elevada que la carga de las especies individuales. Esto no solo promueve su oligomerización, sino que puede llegar a aumentar la interacción con las membranas bacterianas y en otras instancias de daño celular puede interactuar con las moléculas de ADN y ARN bacterianas, interfiriendo con los procesos celulares de transcripción y traducción⁶⁵. Se cuenta en la literatura con un reporte de la expresión de HBD2 en tándem homomérico, en el que se evaluaron 2, 4 y 8 unidades de la defensina⁸¹. El mejor rendimiento se obtuvo cuando dos unidades de HBD2 se expresaron unidas a la proteína de fusión Trx. Desafortunadamente, la actividad antimicrobiana de éstas construcciones no se reportó. Hasta el momento no se cuenta con un reporte de expresión de un tándem heteromérico de HBDs, como el realizado en la presente investigación, donde se ha demostrado un alto nivel de expresión para HBD3-M-HBD2 (Figuras 10-A y 10-B; Tabla 17), además de su efectividad como péptido antimicrobiano contra microorganismos patógenos como *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *M. tuberculosis* (Tablas 18, 19 y 20).

7.5.3 Estrategia para expresar HBD2: algunas variantes

Siguiendo un proceso semejante al desarrollado para la expresión de pQE30::HBD3, no fue posible obtener producto de pQE30::HBD2. De manera que se propuso incrementar la similitud entre HBD2 y HBD3. Inicialmente se pensó en la diferencia de tamaño entre las defensinas, por lo que se decidió hacer una construcción que presentara cuatro aminoácidos adicionales (Gly-Gly-Ser-Gly) ubicados justo antes de la secuencia de reconocimiento para el factor Xa (Figura 13), pero sin éxito alguno.

Buscando otras estrategias y comparando las secuencias alineadas de HBD2 y HBD3, encontramos que en la región α -hélice de HBD3 existe una mayor presencia de aminoácidos catiónicos, comparada con la HBD2 (Figura 11). Así que se decidió insertar una triada compuesta por los residuos de aminoácidos Lys-Leu-Lys (KLK) en la región α -hélice de HBD2 y con ayuda de un modelado *in silico*, se asume que la presencia de los aminoácidos adicionales se mantuvieron en dicha región de la estructura de la HBD2

(Figura 12). La elección racional de dichos aminoácidos se basó en reportes previos que indicaban que la presencia de residuos de aminoácidos de naturaleza básica e hidrofílicos, pueden mejorar la capacidad de la interacción de los AMPs con las membranas de microorganismos patógenos^{64,82,83}. También se ha sugerido que la presencia en regiones α -hélice, de aminoácidos cargados positivamente que estén rodeados de residuos de aminoácidos de naturaleza hidrofóbica, pueden llegar a generar mayor actividad antimicrobiana⁸³. Por tanto, con base en la comparación de secuencias entre HBD3 y HBD2, que solo comparten un 35% de identidad pero que estructuralmente son similares, se encontró que HBD3 tiene mayor cantidad de cargas positivas en la α -hélice de la región N-terminal, lo que es semejante a otros péptidos biológicamente activos^{3,11}. Además de la inserción de los aminoácidos KLIK, también se trataron otras construcciones en las que se adicionaron diferentes aminoácidos y que podían estar dentro o fuera del gen que codifica para HBD2 (Figura 13). Con todas éstas construcciones se trató de encontrar una expresión heteróloga satisfactoria en cantidad del péptido HBD2. Desafortunadamente ninguna de las construcciones diseñadas para el vector de expresión pQE30, mostró una expresión tal que permitiera llegar a realizar los ensayos biológicos necesarios y la presencia de algunos de ellos solo se logró detectar por inmuno-*blot* (Figura 14). La construcción que llegó a generar un poco más de péptido heterólogo fue pQE30::HBD2-KLIK, que produjo 30 $\mu\text{g/L}$ de péptido y que en el único ensayo biológico que pudo hacerse con él, mostró actividad inhibitoria del crecimiento de la cepa de *E. coli* ATCC 25922.

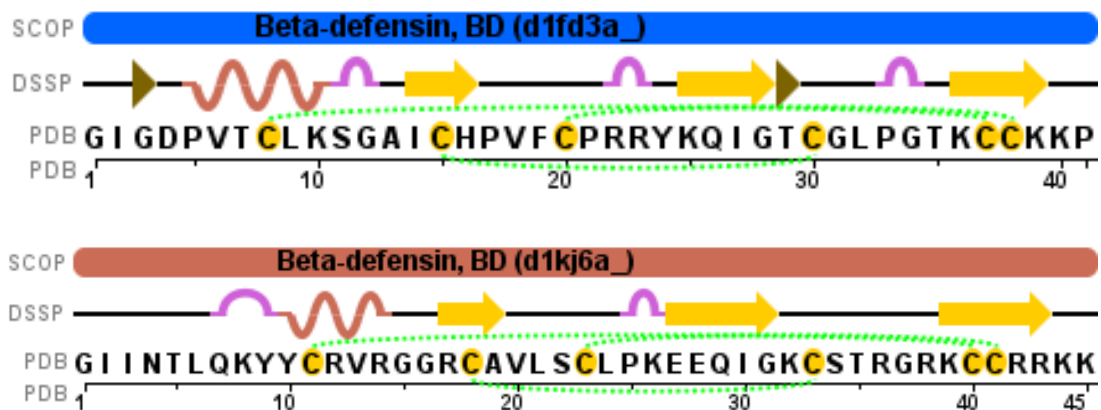


Figura 11. Secuencias de HBD2 (PDB 1fd3) y HBD3 (PDB 1kj6) en las que se muestran las posiciones de las α -hélices y las hojas β .

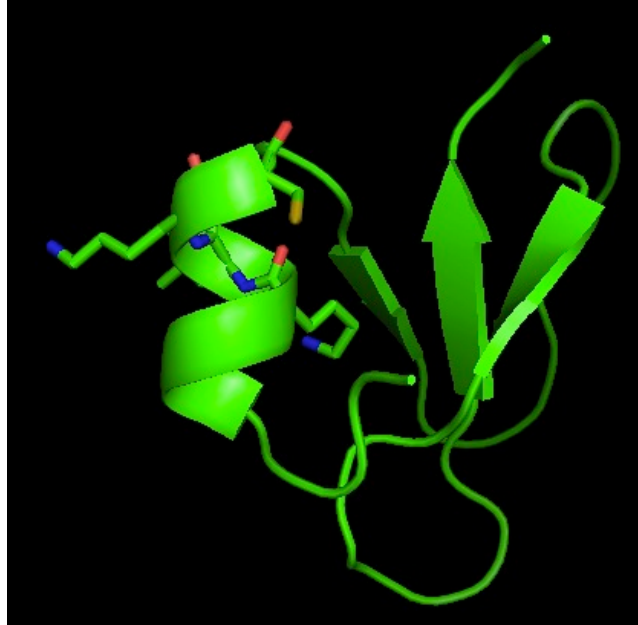


Figura 12. Modelado de HBD2 con la inserción de KLK en la región α -Hélice de su estructura. La estructura fue adquirida mediante el servidor ESyPred3D.

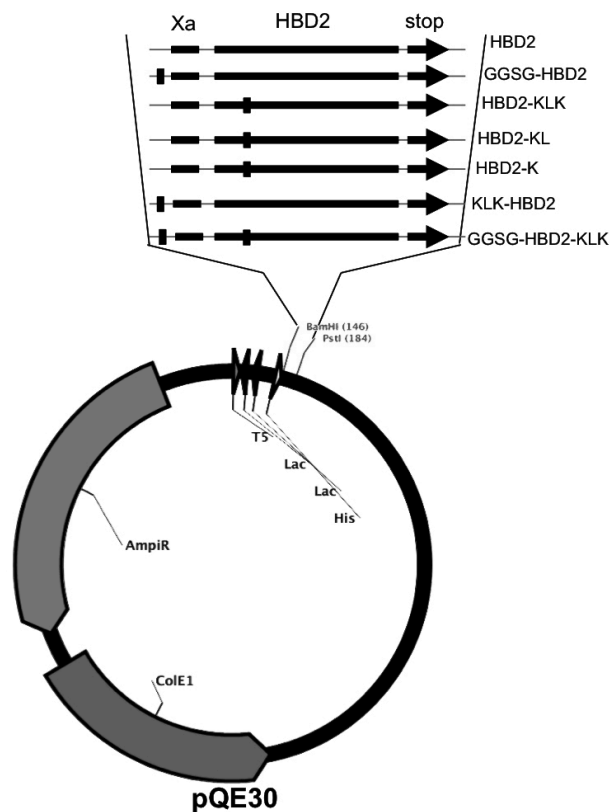


Figura 13. Algunas variantes de la construcción pQE30::HBD2. “■” indica el lugar de la inserción de los aminoácidos en cada variante. Los péptidos producto de las construcciones HBD2-KLK, HBD2-KL y HBD2-K se detectaron por inmuno-*blot*. Las proteínas expresadas mediante las construcciones HBD2, GGSG-HBD2, KLK-HBD2 y GGSG-HBD2-KLK no fueron detectadas en análisis de inmuno-*blot*.

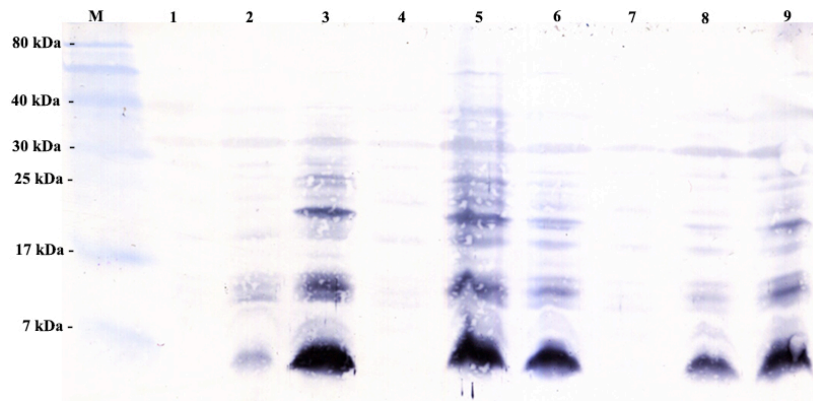


Figura 14. Inmuno-*blot* producto de expresión de variantes pQE30::HBD2 en la cepa *E. coli* M15[pRep]. Líneas: M-Marcador molecular. 1-plásmido pQE30 sin inserto. 2-pQE30::HBD2 inducida. 3-pQE30::HBD2-KLK inducida. 4- pQE30::HBD2-KL antes de inducir. 5- pQE30::HBD2-KL 3 horas después de inducir. 6- pQE30::HBD2-KL final de la inducción. 7- pQE30::HBD2-K antes de inducir. 8-pQE30::HBD2-K 3 horas después de inducir. 9- pQE30::HBD2-K final de la inducción.

Debido a los resultados negativos en este sistema de expresión, se decidió probar otro vector de expresión que permitieran llegar a obtener el producto con cantidades suficientes para realizar los ensayos biológicos y fue así como se llegó al plásmido pET28a(+).

7.5.4 Expresión pET28a::HBD2 y su variante pET28a::HBD2-KLK

Para obtener las construcciones pET28::HBD2 y pET28::HBD2-KLK, se inició a partir la digestión de los plásmidos de secuencia confirmada pQE30::HBD2 y pQE30::HBD2-KLK con las enzimas *Bam*HI y *Hind*. Posteriormente se realizó la ligación en el plásmido pET28a(+) digerido con las mismas enzimas de restricción. La expresión de HBD2 y HBD2-KLK se realizó en la cepa BL21 (DE3) y el proceso de expresión fue semejante al ya mencionado, sin embargo tiene algunas modificaciones que fueron determinadas luego del diseño experimental factorial (Anexo 3). Entre ellas se tiene que la densidad celular del cultivo al momento de la inducción fue mayor, la concentración de IPTG usada fue de 0.1 mM, la temperatura de inducción se estableció a 20 °C y un tiempo de inducción de 4 horas. La mayoría de las investigaciones concernientes a la expresión de proteínas, utilizan una baja densidad óptica (p.ej. 0.5 U) en el momento de realizar la inducción (ver Tabla 4), pero en ésta investigación, se ha encontrado es posible aumentar la producción de péptidos recombinantes, realizando la inducción a mayores densidades ópticas de población microbiana (1.0 U ó 1.3 U).

El proceso de producción de HBD2 y HBD2-KLK se realizó de la manera descrita en el apartado 6.6, aunque con los cambios que generaron los resultados del diseño experimental. Al finalizar el proceso de inducción las células se recolectaron y se rompieron. Se encontró que el péptido heterólogo estaba principalmente en la fracción soluble y con una pequeña presencia en la fracción insoluble. Cuando los péptido se analizaron por Tricina SDS-PAGE (15 %) se detectó que el peso molecular aparente de

ambos péptidos recombinantes estaban un poco por debajo del esperado (Figura 15-A y 16-A). Sin embargo la presencia de HBD2 y HBD2-KLK se confirmó por inmuno-*blot* (Figura 15-B y 16-B), por tanto puede decirse que ésta discrepancia puede deberse a un artefacto electroforético. Al momento de realizar el proceso de purificación de la fracción soluble por columna de afinidad de Ni, se presentó una precipitación masiva del péptido, dando como resultado la pérdida de todo el material. De manera que se decidió tratar la fracción soluble con GndHCl con lo que se evitó la agregación del péptido y la proteína de interés se separó del extracto celular por IMAC-Ni-NTA en varias fracciones de elución, que se sometieron a reducción y posteriormente se purificaron por RP-HPLC (C₄) (Figuras 15-C, 16-C), hasta obtener el péptido puro, que se evaluó tanto por Tricine-SDS-PAGE como por inmuno-*blot* (Figuras 15-A-B, 16-A-B, líneas 6 y 7). Los análisis de espectrometría de masas, indicaron que HBD2 tiene una masa molecular reducida de 8,202.4 kDa y HBD2-KLK de 8,571.9 kDa, que corresponden a los valores teóricos (Tabla14, Figuras 15-D, 16-D).

Los rendimientos de expresión para HBD2 y HBD2-KLK, después de cada paso de purificación se muestran en la Tabla 17. Las expresiones de HBD2 y HBD2-KLK generaron 6 g/L de biomasa en peso húmedo. Semejante a lo observado en los péptidos expresados en pQE30, la mayor disminución en el rendimiento se apreció luego de los procesos de tratamiento de la fracción soluble y del paso por la columna de afinidad. Finalmente, se recuperaron 4 y 3 mg/L de HBD2 y HBD2-KLK respectivamente.

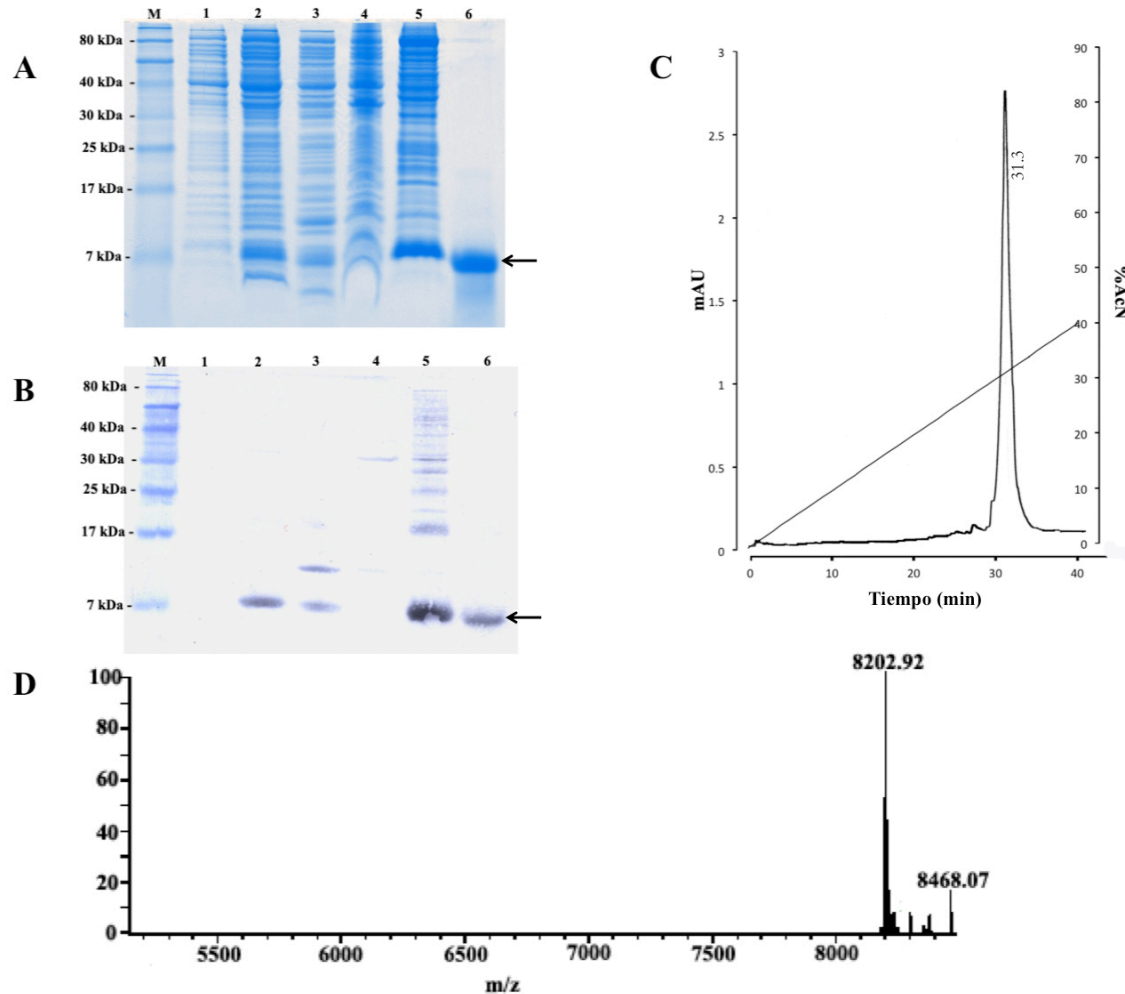


Figura 15. Expresión y purificación de HBD2. (A) Gel de Tricina SDS-PAGE luego de la tinción con Coomassie (10 μ g de proteína total en la línea 1; 20 μ g en las líneas 2 a 5 y 2 μ g en la línea 6). Líneas: M- Marcador de peso molecular; 1- Células antes de inducción; 2- Células después de inducción; 3- Fracción soluble; 4- Fracción Insoluble; 5- Purificación por IMAC-Ni-NTA; 6- Péptido luego de purificación por RP-HPLC analítica. (B) Análisis de expresión por inmuno-*blot*; detección del péptido recombinante con el anticuerpo anti-His6 acoplado a peroxidasa (10 μ g de proteína total en las líneas 1 a 5 y 0.5 μ g en la línea 6). (C) Cromatograma producto de la purificación RP-HPLC analítica de HBD2. Tiempo de retención 31.3 minutos correspondientes a 31.3% de AcN. (D) Análisis de espectrometría de masas de HBD3. Masa molecular esperada de 8,202.9 kDa y masa molecular experimental obtenida 8,202.4 kDa. Las flechas indican la presencia del péptido de interés.

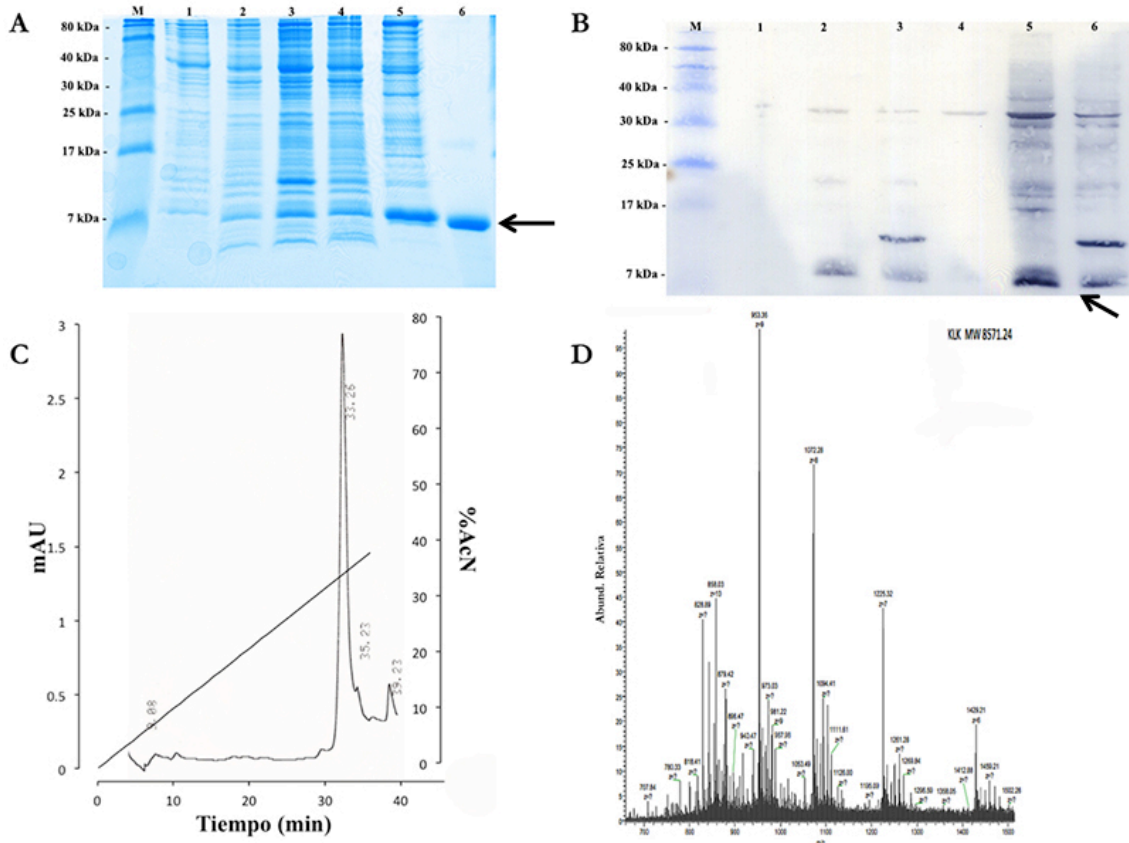


Figura 16. Expresión y purificación de HBD2-KLK. (A) Gel de Tricina SDS-PAGE luego de la tinción con Coomassie (10 μ g de proteína total en las línea 1 y 2; 20 μ g en las líneas 3 a 5 y 2 μ g en la línea 6). Líneas: M- Marcador de peso molecular; 1- Células antes de inducción; 2- Células después de inducción; 3- Fracción soluble; 4- Fracción Insoluble; 5- Purificación por IMAC-Ni-NTA; 6- Péptido luego de purificación por RP-HPLC analítica. (B) Análisis de expresión por inmuno-*blot*; detección del péptido recombinante con el anticuerpo anti-His6 acoplado a peroxidasa (10 μ g de proteína total en las líneas 1 a 5 y 0.5 μ g en la línea 6). (C) Cromatograma producto de la purificación RP-HPLC analítica de HBD2-KLK. Tiempo de retención 33.2 minutos correspondientes a 33.2% de AcN. (D) Análisis de espectrometría de masas de HBD3. Masa molecular esperada de 8,571.2 kDa y masa molecular experimental obtenida 8, 571.9 kDa. Las flechas indican la presencia del péptido de interés.

Algunas investigaciones han demostrado que la presencia de residuos de aminoácidos básicos, pueden mejorar significativamente la capacidad biológica de interacción de un péptido de naturaleza bactericida, sobre membranas de algunos microorganismos patógenos^{64,82,83}. Otros reportes han sugerido que la presencia de residuos de aminoácidos básicos rodeados de aminoácidos no polares, en las α -hélices, pueden llegar a mejorar la actividad antimicrobiana del péptido⁸³. Basándonos en la comparación de secuencias entre HBD2 y HBD3, que solo comparten un 35 % de similitud en la secuencia pero que estructuralmente son semejantes, se encontró que HBD3 tiene mayor número de cargas positivas en su extremo N-terminal (región α -hélice), similar a otros péptidos biológicamente activos^{3,11}. De manera que se decidió incrementar el número de residuos de aminoácidos cargados positivamente en la región α -hélice del N-terminal de HBD2 insertando el triplete de aminoácidos KLK (HBD2-KLK) y determinar si el incremento daba como resultado una mejora en las propiedades antimicrobianas de éste péptido contra

bacterias Gram (+). Se encontró que la CMI de HBD2-KLK es mejor comparada con la actividad de HBD2 cuando se probaron los microorganismos *S. aureus* and *P. aeruginosa* (Tabla 18). Es importante mencionar que a pesar de la alta similitud entre las secuencias de HBD2 y HBD2-KLK, se encontraron diferencias en los niveles de expresión y de actividad biológica. Esto puede tal vez ser explicado por el contenido de lisina (K), de quien se sabe que afecta los niveles de expresión así como el rendimiento de recuperación en algunos sistemas heterólogos de expresión, especialmente en *E. coli*^{42,75}.

7.6 Plegamiento de los péptidos

La formación de los puentes disulfuro es generalmente favorecida por un pH básico y la presencia de agentes, como el glutatión oxidado, puede incrementar el plegamiento oxidativo, mientras que la presencia de agentes desnaturizantes, como urea y GdnHCl, impiden el proceso de plegamiento⁴⁰. Es así como el proceso de plegamiento en las defensinas humanas recombinantes se realizó *in vitro* y bajo condiciones controladas en presencia de 2 M de GndCl en *Buffer* Tris-HCl 0.05 M pH 8.0, 1 mM de glutatión reducido (GSH) y 0.1 M de glutatión oxidado (GSSH). El material peptídico para la reacción fue corroborado previamente en su masa molecular correcta para estado reducido. Pasadas 24 horas de incubación de la mezcla de reacción a temperatura ambiente, las diferentes muestras fueron purificadas por RP-HPLC. Se obtuvieron cromatogramas que mostraron varias fracciones (Figura 17), las cuales fueron enviadas a evaluación de su masa molecular. Considerando las masas moleculares teóricas y experimentales, tanto de los estados oxidados como reducidos de los diferentes péptidos expresados en ésta investigación, puede decirse que de todos ellos se obtuvo con éxito el valor esperado (Tabla 15) (Anexo 2, Figuras A-8 a A-11), por tanto, puede afirmarse con certeza, que los diferentes ensayos biológicos llevados a acabo se realizaron con los péptidos recombinantes diseñados específicamente en éste trabajo.

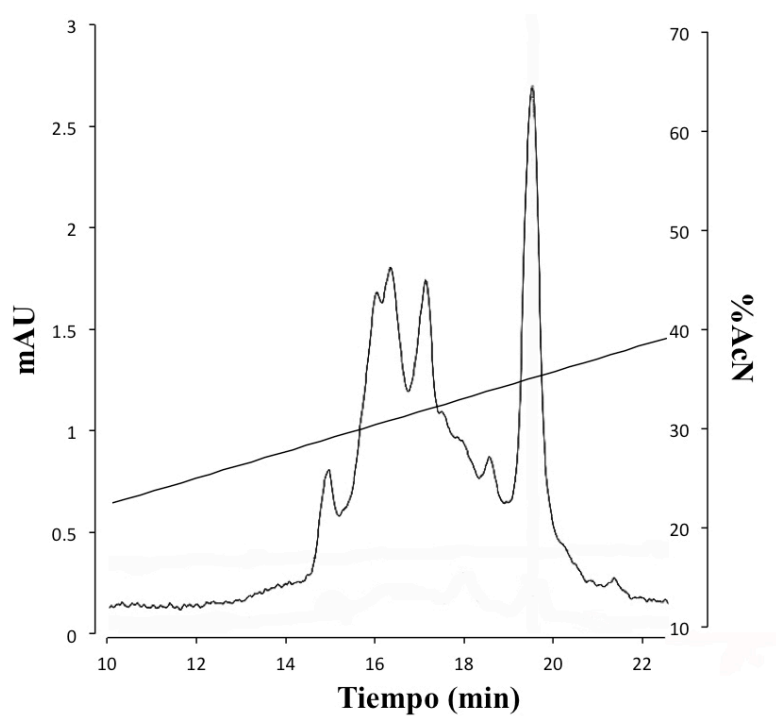


Figura 17. Cromatograma de HBD3 obtenido a partir del proceso de oxidación.

Tabla 15. Purificación de defensinas heterólogas: porcentaje de acetonitrilo

Péptido	Porcentaje de Acetonitrilo (%)	
	Reducido	Oxidado
HBD3	33.7	34.5
HBD3-M	34.4	35.5
HBD3-M-HBD2	35.75	38.0
HBD2	31.3	33.5
HBD2-KLK	33.2	34.0

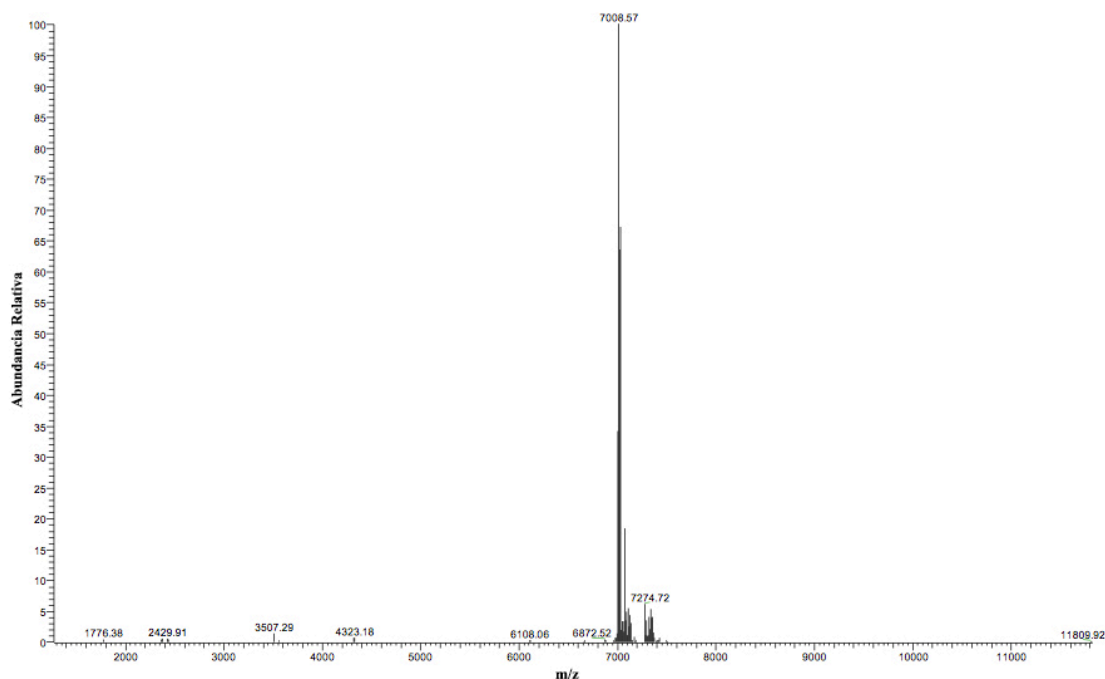


Figura 18. Espectro de masa de HBD3 Oxidada. Se muestra un valor de 7,008.57 Da, que corresponde al valor del péptido en forma oxidada.

7.7 Determinación de la concentración de los péptidos heterólogos

La concentración de un péptido puede calcularse por la ley de Beer-Lambert que ha demostrado una relación lineal entre la absorbancia (A) del péptido y su concentración molar (c), por medio de la siguiente ecuación:

$$A = \varepsilon \times c \times l$$

donde ε es el coeficiente de absortividad molar ($M^{-1}cm^{-1}$) y l es la longitud de paso (cm) del haz de luz, según la celda y el equipo⁸⁴. Las cadenas laterales de algunos aminoácidos que contienen residuos de aminoácidos aromáticos (como tirosina, triptófano y fenilalanina) generan una absorción bajo la luz ultravioleta (UV). De manera que los péptidos pueden absorber luz UV en proporción al contenido de aminoácidos aromáticos que presenten en su secuencia. En general, se ha demostrado que los aminoácidos triptófano (Trp, W), tirosina (Tyr, Y) y en menor grado la cistina (Cys-Cys, C-C), contribuyen a la absorbancia de un péptido a una longitud de onda por encima de 275 nm⁸⁵. Y son dichos aminoácidos los que permiten llegar a conocer el coeficiente de absortividad molar (ε) por medio de la ecuación⁸⁵:

$$\varepsilon_{280} = (5500 \times \eta_{Trp}) + (1490 \times \eta_{Tyr}) + (125 \times \eta_{Cys-Cys})$$

donde η representa el número de aminoácidos presentes en la secuencia, ya sean Trp, Tyr o Cys-Cys, respectivamente. Una vez establecido el ε de un péptido dado, es posible determinar la concentración del mismo en una solución acuosa a partir de su absorbancia.

En ésta investigación la determinación del coeficiente de extinción molar para cada uno de los péptidos heterólogos, se obtuvo por medio de la herramienta en línea ProtParam

(<http://web.expasy.org/protparam/>), que utiliza el mismo algoritmo explicado anteriormente, además determina el valor del coeficiente de extinción molar si el péptido se encuentra en forma reducida (Tabla 16). Considerando que HBD2 (Tyr = 1, Cys=6), HBD3 (Tyr =2 Cys =6) y HBD3-M-HBD2 (Tyr =3 Cys =12), puede decirse que la precisión de la determinación de la concentración es del 90 %.

Tabla 16. Masa moleculares y coeficientes de extinción molar teóricos de las defensinas humanas heterólogas en estados reducido y oxidado.

Péptido	Masa Molecular (Da)				Coeficiente de extinción Molar ($M^{-1}cm^{-1}$)	
	Reducido		Oxidado		Reducido	Oxidado
	Teórico	Exp.	Teórico	Exp.		
HBD3	7,015.2	7,015.5	7,009.2	7,008.5	2,980	3,355.2
HBD3-M	7,146.4	7,146.6	7,140.4	7,139.5	2,980	3,355.2
HBD3-M-HBD2	11,822.0	ND	11,810.0	11,809.9	4,470	5,220
HBD2	8,202.4	8,202.9	8,196.4	8,196.0	1,490	1865
HBD2-KLK	8,571.9	8,571.2	8,565.9	8,565.1	1,490	1865

ND: no determinado por la formación de agregados e isoformas (de aproximadamente 62 Da) que podrían ser derivadas de la formación masiva de aductos de Na^+ y K^+ .

7.8 Rendimientos en las expresiones

Durante el proceso de expresión y obtención de los péptidos heterólogos, se establecieron una serie de pasos en los que fue posible monitorear la presencia y concentración de las defensinas humanas recombinantes. Es así como se determinó la presencia de proteína total en el extracto celular crudo, en las fracciones solubles e insolubles y en el producto de la purificación por IMAC-Ni por medio del método de BCA; la concentración de los péptidos obtenidos de las purificaciones por RP-HPLC fueron determinadas por absorbancia con ayuda del coeficiente de extinción molar (Tabla 16). Teniendo las concentraciones totales de proteína se procedió a hacer geles de Tricina-SDS-PAGE en donde se cargó una cantidad conocida de proteína y posteriormente los genes pudieron ser analizados con ayuda del equipo ChemiDoc y con el software ImageLab (BioRad) y así pudo finalmente determinarse la cantidad de proteína de interés presente en cada paso de purificación además de la pureza del péptido (Tabla 17).

Tabla 17. Pasos de purificación y rendimiento de la defensas heterólogas

Péptido	Paso de Purificación	Proteína Total ^a (mg/L)	Defensina Recombinante ^{a,b} (mg/L)	Rendimiento (%)	Pureza ^b (%)
HBD3	Extracto Celular ^c	576 ± 43	80 ± 20	100	16 ± 3
	Extracto Crudo (Insoluble)	436 ± 10	66 ± 3	82.5	15.1 ± 0.6
	IMAC-Ni	61.3 ± 8	20 ± 0.9	25	32.7 ± 3
	RP-HPLC-S (C ₁₈)	4.2 ± 0.4	3.8 ± 0.5	4.8	89.3 ± 3
	RP-HPLC-A (C ₁₈)	3.8 ± 0.4	3.4 ± 0.4	4.3	89.6 ± 3
HBD3-M	Extracto Celular ^d	572 ± 59	87 ± 14	100	15.5 ± 0.5
	Extracto Crudo (Insoluble)	436 ± 10	61.4 ± 9	70.6	14.1 ± 2.2
	IMAC-Ni	42.1 ± 7	18.2 ± 7	21.6	43 ± 5
	RP-HPLC-S (C ₁₈)	16 ± 1	14.8 ± 0.6	17	92.3 ± 3
	RP-HPLC-A (C ₁₈)	10.1 ± 0.7	9.5 ± 0.3	10.9	93.1 ± 3
HBD3-M-HBD2	Extracto Celular ^e	380±23	58.3±9	100.0	15.3±4
	Extracto Crudo (Insoluble)	111.2±8	26.4±2	45.3	23.7±1
	IMAC-Ni	39±6	20.4±8	35.0	52±8
	RP-HPLC-S (C ₁₈)	8.2±0.4	6.5±0.1	11.1	80±2
	RP-HPLC-A (C ₁₈)	6.2±0.3	5.5±0.1	9.4	90±2
HBD2	Extracto Celular ^f	602 ± 90	57.7 ± 8	100.0	9.5 ± 1
	Extracto Crudo (Soluble)	446.8 ± 40	39 ± 5	67.6	9.6 ± 2
	IMAC-Ni	71.6 ± 8	20 ± 3	34.7	27 ± 1
	RP-HPLC-A (C ₄)	4.1 ± 0.2	4 ± 0.1	6.9	95.2 ± 4
HBD2-KLK	Extracto Celular ^g	441 ± 41	39.7 ± 10.5	100	9 ± 3
	Extracto Crudo (Soluble)	386.1 ± 17	28.9 ± 2	72.9	10.2 ± 0.6
	IMAC-Ni	33.2 ± 8	7.5 ± 1	18.9	24 ± 4
	RP-HPLC-A (C ₄)	3.2 ± 0.5	3 ± 0.4	7.6	92 ± 1.2

^a Concentración de proteína determinada por BCA usando BSA como estándar proteico

^b Proteína de interés, estimada por densitometría en gel PAGE con ChemiDoc System (BioRad)

^c Obtenido a partir de 5 ± 0.1 g de botón celular húmedo de *E. coli* en 1 L cultivo (n=3)

^d Obtenido a partir de 6 ± 0.4 g de botón celular húmedo de *E. coli* en 1 L cultivo (n=3)

^e Obtenido a partir de 5 ± 0.3 g de botón celular húmedo de *E. coli* en 1 L cultivo (n=3)

^f Obtenido a partir de 6 ± 0.2 de botón celular húmedo de *E. coli* en 1 L cultivo (n=6)

^g Obtenido a partir de 6 ± 0.3 de botón celular húmedo de *E. coli* en 1 L cultivo (n=5)

Llevar a cabo el registro de la presencia de un péptido expresado permite detectar en que paso de la purificación puede darse la mayor pérdida del mismo. En general puede decirse que el rendimiento en la obtención del producto recombinante, muestra mayor pérdida cuando se realiza el paso de purificación por columna de afinidad IMAC-Ni, con valores que están en el orden de 50 a 60 % de pérdida. Aquellas purificaciones que constaron de dos pasos de RP-HPLC demostraron que no es necesario realizar el segundo paso de purificación analítica, puesto que por una parte los rendimientos se reducen y la pureza final del péptido es similar a la que se obtiene con la purificación semipreparativa.

Como se observa en la tabla 17, los rendimientos de las HBDs son apreciables. Para HBD3, HBD3-M, HBD3-M-HBD2, HBD2 y HBD2-KLK el rendimiento global fue 3.4, 9.5, 5.5, 4 y 3 mg/L, respectivamente, con una pureza mayor del 90 %, como fue

determinada por análisis de imágenes de los geles de poliacrilamida. A primera vista, éstos resultados pueden parecer bajos cuando se comparan con otros reportes. Por ejemplo, se tienen registros de rendimientos del orden de 346 mg/l para Trx-HBD2³¹ y 1 g/L para Trx-HBD3²⁵. Sin embargo, dichas investigaciones reportaron los rendimientos sin realizar la separación de la defensina y de la proteína de fusión Trx, ni hacer las purificaciones concernientes, además las estimaciones de rendimientos totales se realizaron sobre el gel, no por cuantificación del péptido después de todos los procesos de purificación. Dichos reportes tampoco evalúan la pureza de sus productos y no realizan el análisis de la determinación de la masa molecular de las defensinas, de manera que puedan confirmar su identidad y/o integridad.

7.9 Corte con CNBr

Los cortes químicos con CNBr son bastante eficientes, pero pueden llegar a presentarse modificaciones de las cadenas laterales de los aminoácidos o el corte inespecífico, cuando las reacciones se desarrollan durante un tiempo prolongado a bajo pH. Por éste motivo fue necesario llevar a cabo pruebas de corte que permitieran determinar el tiempo de incubación necesario para lograr la separación de los residuos de aminoácidos unidos a la defensina. Se evaluaron tiempos de 0, 7, 24, 48 y 72 horas, encontrando que el tiempo más adecuado es de 24 horas de reacción del péptido con el reactivo CNBr disuelto en ácido fórmico 70%, en donde pudo observarse que la HBD3 liberada mostraba una masa molecular aparente de aproximadamente 5 kDa (Figura 19). Se observó que en la medida en que el tiempo iba incrementándose, la degradación del péptido se hacía cada vez mayor, debido principalmente al pH bajo, que también pueden conducir a la desnaturalización de la proteína o a la modificación de algunas cadenas laterales de los residuos de aminoácidos⁵⁵.

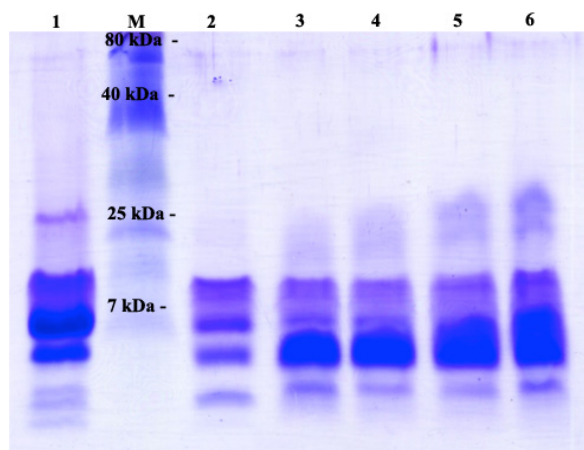


Figura 19. Corte de HBD3-M con CNBr. Líneas: M-marcaador de peso molecular; 1- HBD3-M sin cortar; 2- 0 horas; 3- 7 horas; 4- 24 horas; 5- 48 horas; 6- 72 horas de reacción.

7.10 Actividad antimicrobiana

Todas las construcciones obtenidas en ésta investigación incluían un formato que permitía separar la HBD de los otros residuos de aminoácidos con los que era expresado (ver Tabla 14). Pero antes de realizar los procesos de corte y separación, se decidió probar la actividad antimicrobiana, encontrándose que todos presentaban dicha actividad. Éste resultado está en concordancia con otros resultados que demuestran que la presencia de aminoácidos extras no tienen influencia en la actividad antimicrobiana de los CAMP. Por ejemplo Song *et al.* (2009)²⁵, concluyó en su investigación que aún usando proteínas de fusión de gran tamaño como la Trx, la actividad antimicrobiana no se veía afectada.

Los péptidos recombinantes HBD3, HBD3-M y HBD3-M-HBD2, mostraron concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) por ensayos de difusión en agar⁵⁰ en medio sólido de 5 µM sobre las tres cepas evaluadas *E. coli*, *S. aureus* and *P. aeruginosa*. A menor inhibición en el crecimiento bacteriano corresponden mayores CMI, en este caso HBD2 y HBD2-KLK tuvieron CMI de 10 y 5 µM para *E. coli*, 40 y 20 µM para *S. aureus*, y 80 y 40 µM para *P. aeruginosa*, respectivamente.

La inhibición del crecimiento bacteriano en medio líquido se realizó en placas de 96 pozos donde se registró el crecimiento de las bacterias mediante la absorbancia de los cultivos a una longitud de onda de 600 nm durante un período de 8 horas. Los resultados no fueron muy diferentes a los resultados de difusión en agar (Figura 20). Cabe notar un incremento en la actividad antibiótica para la defensina en tándem, demostrándose posiblemente un efecto aditivo de HBD3 y HBD2 (Tabla 18). Los resultados muestran una correlación positiva entre el número de cargas básicas de los péptidos y la actividad antimicrobiana, que se presenta en el siguiente orden:

$$\text{HBD3-M-HBD2} > \text{HBD3-M} = \text{HBD3} = \text{HBD2-KLK} > \text{HBD2}$$

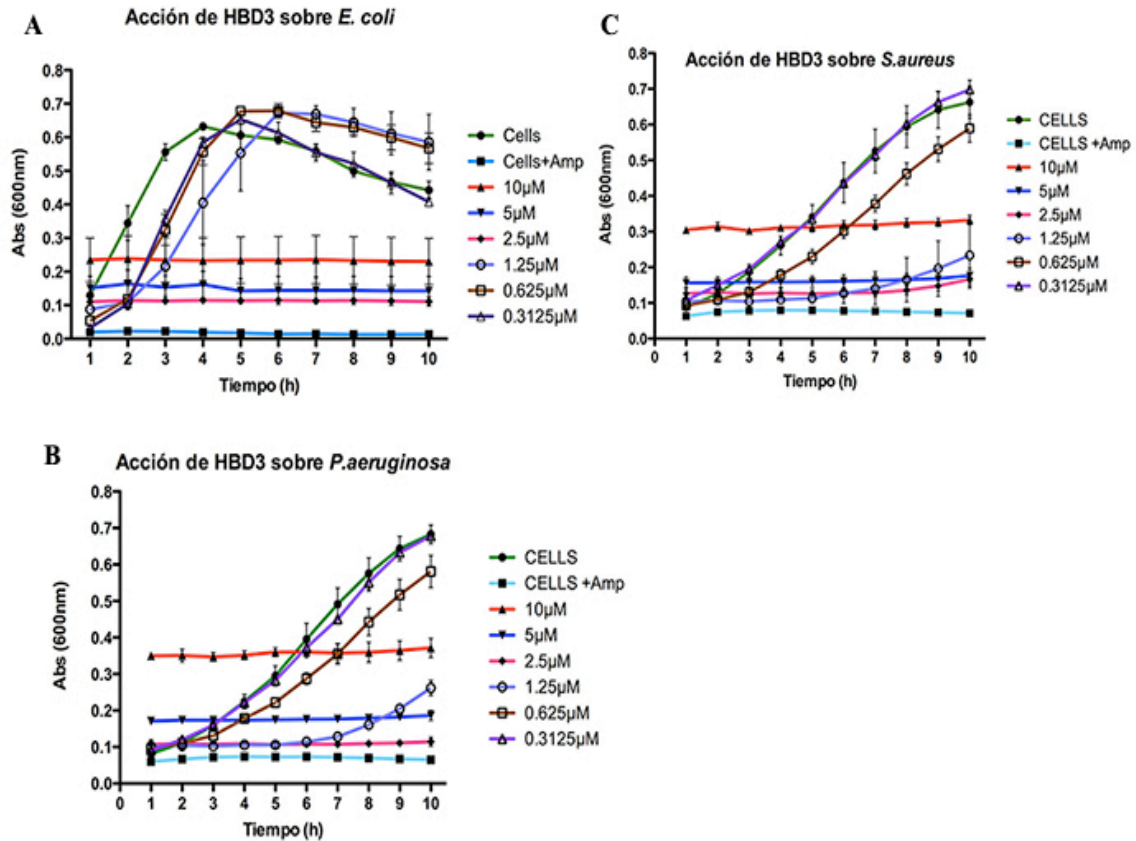


Figura 20. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de HBD3 sobre tres cepas patógenas. Se representan diferentes concentraciones del péptido HBD3 desde 0.3 hasta 10 μM . Concentración inicial de células para todas las concentraciones de péptido. (A) *E. coli*; (B) *S. aureus*; (C) *P. aeruginosa*.

Tabla 18. Actividades antimicrobianas de las HBDs en medio líquido

Defensina	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
	CMI (μM)		
HBD3	5	5	5
HBD3-M	5	5	5
HBD3-M-HBD2	2.5	2.5	2.5
HBD2	5	10	10
HBD2-KLK	5	5	5

El valor del IC_{50} , que es la concentración de péptido que inhibe el 50% del crecimiento de la bacteria, se realizó para cada uno de los péptidos heterólogos generados en éste proyecto por medio de experimentos semejantes a los descritos para la determinación de CMI, haciendo mediciones cada 60 minutos durante 4 horas. Se evaluaron dos microorganismos Gram (-) (*E. coli* y *P. aeruginosa*) y uno Gram (+) (*S. aureus*). La determinación del IC_{50} es una medida más sensible y además es realizada con base en la cinética de la curva de crecimiento del microorganismo en presencia del péptido antimicrobiano usando 1×10^6

células/mL (Figura 21 y Tabla 19). Los valores de IC_{50} se estiman con base en gráficas del porcentaje de inhibición en 240 minutos y en incrementos de concentraciones del péptido evaluado, la media se determinó a partir de 3 valores de dos experimentos independientes.

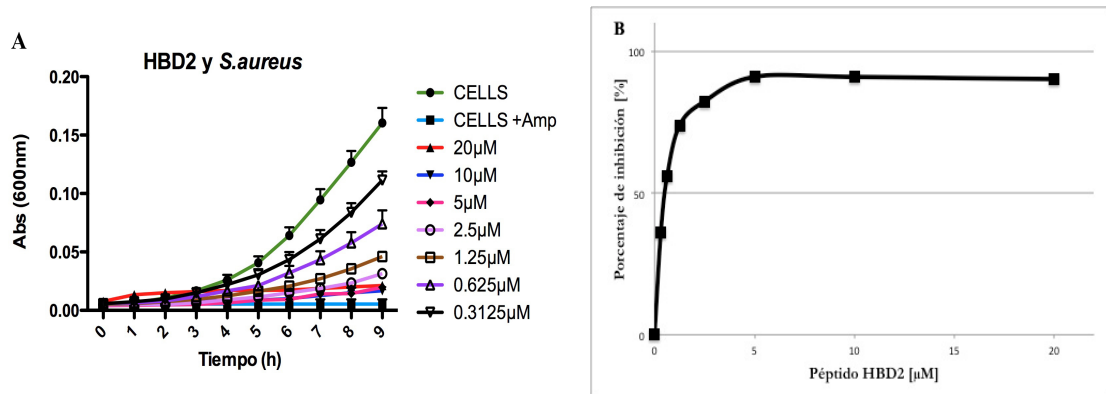


Figura 21. Inhibición del crecimiento de *S. aureus* en la determinación del IC_{50} . (A) Las curvas representan el crecimiento del microorganismo en presencia de diferentes concentraciones del péptido heterólogo HBD2. Los datos corresponden al promedio de al menos tres experimentos independientes y la desviación estándar se representa como barras de error. (B) Curva que permite la determinación del IC_{50} de HBD2 actuando sobre *S. aureus*.

Tabla 19. IC_{50} de los péptidos recombinantes

Microorganismo	IC_{50} (μ M)				
	HBD3	HBD3-M	HBD3-M-HBD2	HBD2	HBD2-KLK
<i>E. coli</i>	0.8	0.4	0.2	0.6	0.5
<i>P. aeruginosa</i>	0.7	0.7	0.3	0.5	0.5
<i>S. aureus</i>	0.6	0.5	0.3	0.5	0.5

La mayoría de las HBDs perdieron su actividad antimicrobiana, casi completamente, cuando se evaluaron sobre medios de cultivo de elevada fuerza iónica, como es el caso del medio Muller-Hinton (MH)⁸⁰. Este medio de cultivo contiene almidón en su composición, que es una molécula cargada negativamente y probablemente interactúe con los péptidos de naturaleza catiónica expresados en ésta investigación, dando como resultado la inhibición de la actividad antimicrobiana. Algunos investigadores han llegado a usar el medio de cultivo MH a un cuarto de su concentración original para realizar los ensayos antimicrobianos y prevenir los inconvenientes antes mencionados, llegando a obtener valores de CMI de 10 μ g/mL o 2 μ M HBD3⁸⁰. De llegar a usar el MH al 100 % de su concentración, se obtienen CMI de más de 300 μ g/mL, equivalente a 60 μ M HBD3⁸⁰.

Algunos investigadores han reportado la CMI de HBD3 sobre varios microorganismos patógenos. Por ejemplo García *et al.* (2001)⁸⁶ demostraron que HBD3 (producida por síntesis química, 40 residuos de aminoácidos y 4,662.6 Da) tenía actividad sobre *P. aeruginosa* PAO 1 (26.5 μ g/mL o 6 μ M), *E. coli* (6.6 μ g/mL o 1.5 μ M) y *S. aureus* ATCC

25923 (más de 26.5 µg/mL o más de 6 µM). Por otro lado Harder *et al.* (2001)²⁰ demostró que la concentración de HBD3 (producida por síntesis química, 45 residuos de aminoácidos y 5,161.2 Da) necesaria para eliminar el 90% de las bacteria de *S. aureus* (ATCC 6538) fue de 2.5 µg/mL (0.5 µM) cuando se utilizaron cultivos del microorganismo de 8×10⁴ células/mL. La concentración celular es aproximadamente dos órdenes de magnitud menor que la usada en la presente investigación.

Al comparar la actividad antimicrobiana de HBD3 recombinante con otras investigaciones, se encontró que el valor de CMI sobre *S. aureus* es mayor que la reportada por Harder *et al.* (2001)²⁰, pero menor que la reportada por Garcia *et al.* (2001)⁸⁶. Aunque en ocasiones no es posible realizar una comparación que pueda llevar a una conclusión, por ejemplo se ha reportado que HBD2 en una concentración de 0.022 µM tiene capacidad de eliminar el 50% del cultivo de *P. aeruginosa*⁸⁷, pero no se reporta la CMI. Cuando se trabaja con la defensina unida a la proteína de fusión Trx, se requirieron más de 25 µg/mL de Trx-HBD3 para impedir el crecimiento de *E. coli* ATCC 25922²⁵ y *E. coli* K12⁸⁸, aunque no se expresa con exactitud cuánto más se necesita para impedir total crecimiento de los microorganismos. También se encuentra el reporte de HBD3 expresada heterológamente y unida a la proteína de fusión GST y que presentó una actividad antimicrobiana de 2.5 µM sobre *E. coli* ATCC 25922⁷⁴. El péptido natural HBD2, obtenido directamente de la piel de pacientes que padecen psoriasis, presentó una actividad antimicrobiana de 23 µM sobre *S. aureus*¹³.

7.11 Actividad anti-*Mycobacterium tuberculosis*

Los ensayos de actividad anti-tuberculosis realizados por el método REMA, mostraron que tanto la HBD3 como HBD3-M tienen actividades semejantes sobre las dos cepas de *M. tuberculosis* evaluadas, aunque fueron menos efectivas cuando se comparan con las otras defensinas recombinantes probadas en el ensayo (Tabla 20). Es así como las actividades anti tuberculosis de HBD2 y HBD2-KLK sobre la cepa H37Rv mostraron valores de CMI de 1.5 y 0.8 µM, siendo las mejores de todas las defensinas humanas probadas. Además es importante anotar, que en éste punto como en otros anteriores vuelve a justificarse la hipótesis, que al aumentar en el número de cargas positivas en la estructura de HBD2 es factible mejorar la actividad biológica de la proteína, como se observó con HBD2-KLK. Por otro lado, la defensina en tándem HBD3-M-HBD2, demostró ser el péptido recombinante más efectivo sobre la cepa MDR con una CMI de 3.3 µM (Tabla 20). Los valores de inhibición exhibidos por las defensinas recombinantes, muestran un comportamiento sobre la cepa H37Rv dentro del rango de los antibióticos comerciales usados para abatir y controlar al bacilo; pero así mismo muestran que la actividad anti-tuberculosis sobre el aislado clínico MDR es hasta 30 o 10 veces mejor en el caso de HBD3-M-HBD2, cuando se compara con antibióticos comerciales como el etambutol y la rifampicina⁸⁹, respectivamente. La diferencia en los comportamientos de HBD2 y HBD3, podría pensarse en términos del lugar en que se detecta la expresión de cada una de las defensinas en el organismo humano. HBD3 ha sido reportada como componente del sistema de defensa de epitelio de piel²⁰, mientras que HBD2 ha sido reportada como

elemento constituyente de las células epiteliales de pulmón y como componentes de la respuesta innata inmune sobre *M. tuberculosis*⁹⁰. De ésta manera se sugiere que existe la posibilidad de utilizar éste tipo de péptidos sobre cepas patógenas que representan un problema de salud pública, considerando que aproximadamente un-tercio de la población mundial está infectada con *M. tuberculosis*, más de 10 nuevos casos de infección con el bacilo ocurren cada minuto y que se cuentan entre 2 y 2.5 millones de muertes anuales en el mundo por ésta enfermedad⁹¹.

Tabla 20. Efecto antimicrobiano de los péptidos recombinantes HBDs sobre las cepas H37Rv y MDR de *Mycobacterium tuberculosis*.

Defensina	H37Rv	MDR	H37Rv	MDR
	CMI (µg/mL)		CMI (µM)	
HBD3	24	96.2	3.4	13.7
HBD3-M	24	96.2	3.4	13.5
HBD3MHBD2	48.1 ± 16	38.7 ± 11.5	4.1 ± 1.3	3.3 ± 1.0
HBD2	12	40 ± 12.4	1.5	4.9 ± 1.5
HBD2-KLK	7.01 ± 2.45	36.1 ± 13.2	0.82 ± 0.3	4.2 ± 1.54
Etambutol ^a	0.5	19.8	2.5	97
Rifampicina ^a	0.4	31.2	0.5	38

^a Referencia Rastogi *et al.*⁸⁹

Nota: Cuando no se presentan las desviaciones estándar, indica que los experimentos por triplicado dieron los mismos resultados

Es sabido que la presencia de la tuberculosis es elevada en la población mundial, pero no todas las personas están infectadas y por tanto debe existir un mecanismo que protege de este tipo de infección, aunque el mecanismo de protección continúa sin ser esclarecido. La inducción de la expresión del gen que codifica para HBD2 se ha demostrado en células epiteliales A549 que fueron infectadas con *M. tuberculosis*. Esto sugiere que HBD2 presente en las células epiteliales de pulmón puede ser un componente de la respuesta inmune en respuesta al microorganismo causante de la tuberculosis, tanto en la infección primaria como en la inmunopatogénesis de la tuberculosis humana⁹⁰. Aunque existen medicamentos específicos que atacan *M. tuberculosis*, tales como isoniazida, estreptomycin, etambutol, gentamicina, kanamicina y rifampicina, no existe actualmente una solución única y completa a éste problema médico, sin contar con la marcada resistencia a los medicamentos que algunas de las cepas de *M. tuberculosis* adquieren constantemente⁹². En ésta investigación se utilizaron las cepas H37Rv (ATCC 27294) y MDR para evaluar la posible actividad anti-tuberculosis de las HBDs recombinantes (Tabla 20). Y es así como se encontró que HBD2 presentó la mejor actividad sobre H37Rv (ATCC 27294) con una CMI de 1.5 µM, valor que se encuentra en el rango observado para gentamicina, etambutol y kanamicina, los cuales reportaron una actividad de 25, 2.5 and 0.4 µM, respectivamente, sobre la misma cepa^{89,91}. Mientras tanto HBD3-M-HBD2 exhibió la mejor actividad sobre la cepa multirresistente MDR con una CMI de of 2.7 µM, que se encontró muy por debajo

de las concentraciones de inhibición para los antibióticos tradicionalmente usados en el tratamiento de éste patógeno, 97 μM para etambutol y 38 μM para rifampicina⁸⁹. Considerando que péptidos como las HBDs pueden generar menor resistencia en bacterias, puesto que en parte su mecanismo de acción está directamente relacionado con la membrana celular que luego puede llegar a desatar un estrés generalizado^{64,93}, las defensinas recombinantes de ésta investigación pueden llegar a ser propuestas como una nueva clase de sustancias terapéuticas⁷⁸.

7.12 Actividad hemolítica

Previamente se ha reportado que los péptidos antimicrobianos de naturaleza catiónica y que poseen carácter hidrofóbico, pueden llegar a generar actividad citotóxica sobre células eucariotas¹¹. Considerando que las defensinas humanas recombinantes expresadas en este trabajo son moléculas catiónicas (HBD3: 13 cargas positivas; HBD2: 7 cargas positivas; HBD2-KLK: 9 cargas positivas y HBD3-M-HBD2: 22 cargas positivas), se evaluó el posible efecto tóxico que pudieran tener sobre células eucariotas y específicamente sobre eritrocitos humanos. En éste ensayo se determinó la liberación de hemoglobina de los eritrocitos, generada por la presencia del péptido en diferentes concentraciones. Como controles se utilizaron Tritón X-100 (10 %) que genera lisis celular por un efecto de detergente; PBS (pH 7.4), una solución isotónica como control negativo, donde no se presenta hemólisis; y el péptido Pin 2 (25 μM) del veneno del escorpión africano *Pandinus imperator*, reportado como hemolítico⁵³. Los resultados mostraron que solo en concentraciones de 50 μM , para cualquiera de los péptidos recombinantes, se observó un 2% de hemólisis (Figura 22), lo cual no es significativo ($P > 0.05$) comparado con la hemólisis generada por el Tritón X-100 y el péptido Pin2, con valores de hemólisis de 100 y 92 % respectivamente. Este resultado es congruente con el reportado por Harder *et al.*²⁰ para la HBD3, quienes demostraron hemólisis del 5 % a una concentración 100 μM . Por tanto éstos resultados indican la baja toxicidad o casi nula hemólisis que las defensinas recombinantes puedan tener sobre células eucariotas, además este resultado es importante, considerando el posible uso de las defensinas recombinantes como una fuente alternativa de nuevos péptidos antibióticos.

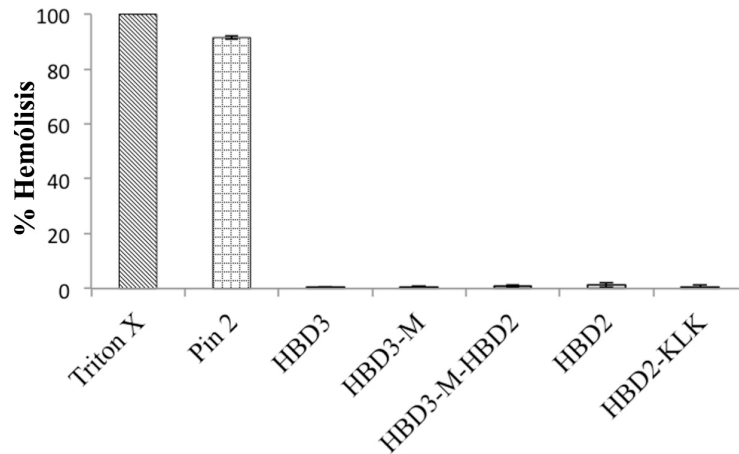


Figura 22. Actividad hemolítica de los péptidos heterólogos tipo defensinas. Concentraciones de las moléculas evaluadas: 10% de Tritón X-100; 25 μ M de Pin 2 y 50 μ M de HBD3, HBD3-M, HBD3-M-HBD2, HBD2 y HBD2-KLK sobre eritrocitos humanos.

Los péptidos antimicrobianos poseen regiones ricas en residuos de aminoácidos hidrofóbicos que son esenciales para la actividad antimicrobiana, pero éstos a su vez pueden aumentar la unión no específica a membranas de células eucariotas, o bien incrementar su actividad hemolítica^{64,94}. Aunque todas las HBDs expresadas en éste trabajo contienen una cantidad apreciable de residuos de aminoácidos de naturaleza hidrofóbica, ninguno de ellos mostró actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos, a diferencia de péptidos como Pin2, indolicina o bactenicina que han sido reportados como antimicrobianos que generan una elevada hemólisis de los eritrocitos^{53,80}. Probablemente las HBDs interactúan con las paredes celulares bacterianas debido a su alto contenido de fosfolípidos y otras moléculas cargadas negativamente llevándolas a su desestabilización. Éste no es el caso de las membranas de eucariotes, puesto que están compuestas principalmente de fosfolípidos neutros de naturaleza zwitteriónica con abundantes unidades de colesterol insertadas en la membrana⁴⁶.

Una de las condiciones ineludibles para lograr la actividad antimicrobiana es la presencia de membranas. Las células humanas son relativamente resistentes a los péptidos antimicrobianos catiónicos, con algunas excepciones como son la melitina de abejas, la mastoparan de avispa y la caribdotoxina de escorpión. La razón de la relativa resistencia de las células humanas puede ser la composición lipídica de la membrana, puesto que los péptidos antimicrobianos pueden preferir membranas que tienen superficies cargadas negativamente, que no posean colesterol y la presencia de un gran potencial eléctrico transmembranal³.

7.13 Actividad quimiotáctica

La determinación de la actividad quimioatrayente de los péptidos heterólogos sobre las células THP-1 se realizó por la comparación de las intensidades lumínicas que reportaron cada uno de los péptidos en diferentes concentraciones. En la Tabla 21 se indican las

concentraciones a las que cada uno de los péptidos desarrolló la mayor intensidad lumínica por efecto de la quimioatracción sobre las células THP-1 previamente marcadas con calceína.

Tabla 21. Concentración óptima (nM) para la máxima quimiotaxis generada por los de péptidos heterólogos sobre las células THP-1

	Concentración de los péptidos (nM)				
	HBD3	HBD3-M	HBD3-M-HBD2	HBD2	HBD2-KLK
Células THP-1	250	250	500	500	500

Reportes anteriores demostraron que la ausencia de puentes disulfuro, ya sea porque el péptido se encuentre en estado reducido o porque se ha impedido químicamente la formación del puente disulfuro, no tuvieron respuesta en la quimioatracción de células tales como monocitos ⁴⁶. Aquí se demostró la diferencia que existe en la capacidad quimiotáctica de una defensina plegada de masa molecular corroborada, y de una defensina en estado reducido. Se encontró que la muestra plegada, presentó una mayor índice quimioatrayente representado en una mayor intensidad lumínica comparada con la muestra reducida. Lo que indica es que la defensina oxidada tiene una mayor capacidad de movilización en forma de atracción sobre las células THP-1 marcadas con calceína comparada a la defensina reducida (Figura 23).

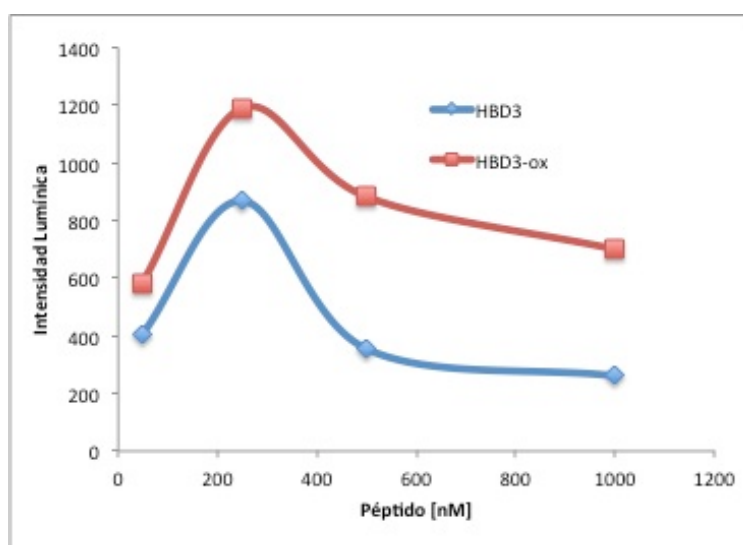


Figura 23. Comparación de la capacidad quimioatrayente de HBD3 reducida y oxidada. La mayor intensidad lumínica se observa aproximadamente en 200 nM de HBD3, pero la intensidad es mayor en el péptido oxidado, indicando mayor nivel de quimioatracción sobre las células THP-1.

8. CONCLUSIÓN

En éste trabajo se demostró que las HBDs pueden ser expresadas en cantidades significativas en la bacteria *E. coli* utilizando los vectores de expresión pET28(a+) y pQE30 en las cepas *E. coli* BL21 (DE3) y M15, respectivamente. Este trabajo reporta por primera vez la expresión de defensinas utilizando el vector pQE30^{65,95}. Los dos sistemas de expresión utilizando pET28a(+) o pQE30 generan proteínas recombinantes con actividad antimicrobiana contra cepas reportadas como patógenas (*E. coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*) e incluyendo las cepas de *M. tuberculosis* H37Rv y MDR. De manera interesante, las HBDs recombinantes fueron activas aún cuando están precedidas de una pequeña secuencia de aminoácidos, lo cual finalmente favorece los rendimientos de cada molécula ya que se evita una pérdida de proteína por el paso de corte proteolítico para liberar la proteína nativa. En vista que las HBDs no mostraron actividad citotóxica contra eritrocitos humanos, podemos proponer a las HBDs recombinantes como moléculas candidatas para futuros compuestos terapéuticos, además la actividad quimioatrayente de las β -defensina puede ser un factor positivo adicional al uso de estas proteínas como antibióticos para uso clínico, ya que podrían aumentar la respuesta del sistema inmunológico del individuo tratado.

9. REFERENCIAS

- 1 Ganz, T. The role of antimicrobial peptides in innate immunity. *Integr. Comp. Biol.* **43**, 300 - 304, doi:10.1093/icb/43.2.300 (2003).
- 2 Selsted, M. E. & Ouellette, A. J. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat. Immunol.* **6**, 551 - 557 (2005).
- 3 Hancock, R. E. W. & Diamond, G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.* **8**, 402 - 410, doi:10.1016/S0966-842X(00)01823-0 (2000).
- 4 Li, J. F., Zhang, J., Zhang, Z., Ma, H. W., Zhang, J. X. & Zhang, S. Q. Production of Bioactive Human Beta-Defensin-4 in Escherichia coli Using SUMO Fusion Partner. *Protein J* **29**, 314-319, doi:Doi 10.1007/S10930-010-9254-4 (2010).
- 5 Fleming, A. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc. R. Soc. Lond.* **93**, 306 - 317, doi:10.1098/rspb.1922.0023 (1922).
- 6 Schwaab, M., Hansen, S., Pearson, M. D., Shagdarsuren, S. & Dazert, S. Human β -defensins—at the front line of the peritonsillar abscess. *Eur. J. Clinical Microbiol. Infect. Dis.*, doi:10.1007/s10096-008-0695-z (2009).
- 7 Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nat.* **415**, 389 - 395, doi:10.1038/415389a (2002).
- 8 Harder, J., Meyer-Hoffert, U., Teran, L. M., Schwichtenberg, L., Bartels, J., Maune, S. & Schröder, J.-M. Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa*, TNF- α , and IL-1 β , but not IL-6, induce human β -defensin-2 in respiratory epithelia. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **22**, 714-721 (2000).
- 9 Peschel, A. & Sahl, H.-G. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat.* **4**, 529 - 536 (2006).
- 10 Tian, Z.-g., Dong, T.-t., Teng, D., Yang, Y.-l. & Wang, J.-h. Design and characterization of novel hybrid peptides from LFB15(W4,10), HP(2-20) and cecropin A based on structure parameters by computer-aided method. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **82**, 1097 - 1103, doi:10.1007/s00253-008-1839-x (2009).
- 11 Hancock, R. E. W. & Chapple, D. S. Peptide Antibiotics. *Antimicrob. Agent Chemother.* **43**, 1317 - 1323 (1999).
- 12 Aerts, A. M., François, I. E. J. A., Cammune, B. P. A. & Thevissen, K. The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 2069 -2079, doi:10.1007/s00018-008-8035-0 (2008).
- 13 Harder, J., Bartels, J., Christophers, E. & Schröder, J.-M. A peptide antibiotic from human skin. *Nat.* **387**, 861, doi:10.1038/43088 (1997).
- 14 Schröder, J.-M. & Harder, J. Human β -defensins-2. *Int. J. Biochemi. Cell Biol.* **31**, 645 - 651, doi:10.1016/S1357-2725(99)00013-8 (1999).
- 15 Hancock, R. E. W. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect. Dis.* **1**, 156 - 164, doi:10.1016/S1473-3099(01)00092-5 (2001).
- 16 Schneider, J. J., Unholzer, A., Schaller, M., Schäfer-Korting, M. & Korting, H. C. Human defensins. *J. Mol. Med.* **83**, 587 - 595, doi:10.1007/s00109-005-0657-1 (2005).
- 17 Bensch, K. W., Raida, M., Mägert, H.-J., Schulz-Knappe, P. & Forssmann, W.-G. hBD-I: a novel β -defensin from human plasma. *FEBS* **368**, 331 - 335, doi:10.1016/0014-5793(95)00687-5 (1995).
- 18 Weinberg, A., Krisanaprakornkit, S. & Dale, B. A. Epithelial antimicrobial peptides:

- review and significance for oral applications. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **9**, 399 - 414 (1998).
- 19 Hancock, R. E. W. & Lehrer, R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.* **16**, 82 - 88, doi:x10.1016/S0167-7799(97)01156-6 (1998).
- 20 Harder, J., Bartels, J., Christophers, E. & Schröder, J.-M. Isolation and characterization of human β -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J. Biol. Chem.* **276**, 5707 - 5713, doi:10.1074/jbc.M008557200 (2001).
- 21 Harder, J. & Schröder, J.-M. RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J. Biol. Chem.* **277**, 46779 - 46784, doi:10.1074/jbc.M207587200 (2002).
- 22 Lehmann, J. *et al.* Expression of human β -defensins 1 and 2 in kidneys with chronic bacterial infection. *BMC Infect. Dis.* **20**, 1 - 10, doi:10.1186/1471-2334-2-20 (2002).
- 23 Lehrer, R. I. & Ganz, T. Defensins of vertebrate animals. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 96 - 102, doi:10.1016/S0952-7915(01)00303-X (2002).
- 24 Mathews, M., Jia, H. P., Guthmiller, J. M., Losh, G., Graham, S., Johnson, G. K., Tack, B. F. & McCray, P. B. Production of β -defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. *Infect. Immun.* **67**, 2740 - 2745 (1999).
- 25 Song, W., Shi, Y., Xiao, M., Lu, H., Qu, T., Li, P., GangWu & Tian, Y. *In vitro* bactericidal activity of recombinant human β -defensin-3 against pathogenic bacterial strains in human tooth root canal. *Int. J. Antimicrob. Agent.* **33**, 237-243, doi:10.1016/j.ijantimicag.2008.05.022 (2009).
- 26 Ganz, T. Versatile defensins. *Sci.* **298**, 977 - 978, doi:10.1126/science.1078708 (2002).
- 27 Cooper, M. D. & Alde, M. N. The evolution of adaptive immune systems. *Cell*, 815 - 822 (2006).
- 28 Aerts, A. M., Thevissen, K., Bresseleers, S. M., Sels, J., Wouters, P., Cammue, B. P. A. & François, I. E. J. A. *Arabidopsis thaliana* plants expressing human β -defensin-2 are more resistant to fungal attack: functional homology between plant and human defensins. *Plant Cell Rep.* **26**, 1391 - 1398, doi:10.1007/s00299-007-0329-4 (2007).
- 29 Lehrer, R. I. Primate defensins. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 727 - 737, doi:10.1038/nrmicro976 (2004).
- 30 Xu, Z., Peng, L., Zhong, Z., Fang, X. & Cen, P. High-level expression of a soluble functional antimicrobial peptide, human β -defensin 2, in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* **22**, 382 - 386, doi:10.1021/bp0502680 (2006).
- 31 García, J.-R. C., Krause, A., Schulz, S., Rodríguez-Jiménez, F.-J., Klüver, E., Adermann, K., Forssmann, U., Frimpong-Boateng, A., Bals, R. & Forssmann, W.-G. Human β -defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J.* **15** (2001).
- 32 Singh, S. M. & Panda, A. K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J. Biosci. Bioeng.* **99**, 303 - 310 (2005).
- 33 Schutte, B. C., Mitros, J. P., Bartlett, J. A., Walters, J. D., Jia, H. P., Welsh, M. J., Casavant, T. L. & Paul B. McCray, J. Discovery of five conserved β -defensin gene clusters using a computational search strategy. *PNAS* **99**, 2129 - 2133, doi:10.1073/pnas.042692699 (2002).
- 34 Yang, D. *et al.* β -Defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Sci.* **286**, 525 - 528 (1999).
- 35 Chen, H., Xu, Z., Xu, N. & Cen, P. Efficient production of a soluble fusion protein containing human β -defensin-2 in *E. coli* cell-free system. *J. Biotechnol.* **115** 307-315, doi:10.1016/j.jbiotec.2004.08.012 (2005).
- 36 Fang, X., Peng, L., Xu, Z., Wu, J. & Cen, P. Cloning and expression of human β -defensin-2 gene in *Escherichia coli*. *Protein Pept. Lett.* **9**, 31 - 37,

- doi:10.2174/0929866023409011 (2002).
- 37 Schibli, D. J., Hunter, H. N., Aseyev, V., Starner, T. D., Wiencek, J. M., McCray, P. B., Tack, B. F. & Vogel, H. J. The solution structures of the human β -defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of hBD3 against *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **277**, 8279 - 8289, doi:10.1074/jbc.M108830200 (2002).
- 38 Xu, Z., Zhong, Z., Huang, L., Peng, L., Wang, F. & Cen, P. High-level production of bioactive human β -defensin-4 in *Escherichia coli* by soluble fusion expression. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 471 - 479, doi:10.1007/s00253-005-0287-0 (2006).
- 39 Trivedi, M. V., Laurence, J. S. & Siahaan, T. J. The role of thiols and disulfides on protein stability. *Curr. Protein. Pept. Sci.* **10**, 614 - 625, doi:10.2174/138920309789630534 (2009).
- 40 Terpe, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 211 - 222, doi:10.1007/s00253-006-0465-8 (2006).
- 41 Piers, K. L., Brown, M. H. & Hancock, R. E. W. Recombinant ADN procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria. *Gene* **134**, 7 - 13, doi:10.1016/0378-1119(93)90168-3 (1993).
- 42 Cipáková, I. & Hostinová, E. Production of the human- β -defensin using *Saccharomyces cerevisiae* as a host. *Protein Pept. Lett.* **12**, 551-554, doi:10.2174/0929866054395761 (2005).
- 43 Chen, H., Fan, L., Xu, Z., Yin, X. & Cen, P. Efficient production of soluble human β -defensin-3-4 fusion proteins in *Escherichia coli* cell-free system. *Process Biochem.* **42**, 423 - 428, doi:10.1016/j.procbio.2006.10.002 (2007).
- 44 Estrada, G., Garcia, B. I., Schiavon, E., Ortiz, E., Cestele, S., Wanke, E., Possani, L. D. & Corzo, G. Four disulfide-bridged scorpion beta neurotoxin CssII: heterologous expression and proper folding *in vitro*. *Biochem. Biophys. Acta.* **1770**, 1161 - 1168, doi:10.1016/j.bbagen.2007.04.006 (2007).
- 45 Wu, Z., Hoover, D. M., Yang, D., Boulègue, C., Santamaria, F., Oppenheim, J. J., Lubkowski, J. & Lu, W. Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human β -defensin 3. *PNAS* **100**, 8880 - 8885, doi:doi:10.1073/pnas.1533186100 (2003).
- 46 Boman, H. G., Agerberth, B. & Boman, A. Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infect. Immun.* **61**, 2978 - 2984 (1993).
- 47 Hoover, D. M., Rajashankar, K. R., Blumenthal, R., Anu Purii, Oppenheim, J. J., Chertov, O. & Lubkowski, J. The structure of human β -defensin-2 shows evidence of higher order oligomerization. *J. Biol. Chem.* **275**, 32911 - 32918, doi:10.1074/jbc.M006098200 (2000).
- 48 Yasukazu, N. *Codon Usage Database*, <<http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=833333>> (2007). Acceso: September 15 2009
- 49 Lehrer, R. I., Rosenman, M., Harwig, S. S. S. L., Jackson, R. & Eisenhauer, P. Ultrasensitive assay for endogenous antimicrobial polypeptides. *J. Immun. Method.* **137**, 167 - 173, doi:10.1016/0022-1759(91)90021-7 (1991).
- 50 Tomasinsig, L., Skerlavaj, B., Scarsini, M., Guida, F., Piccinini, R., Tossi, A. & Zanetti, M. Comparative activity and mechanism of action of three types of bovine antimicrobial peptides against pathogenic *Prototheca spp.* *J. Pept. Sci.* **18**, 105 - 113, doi:10.1002/psc.1422 (2011).
- 51 Palomino, J.-C., Martin, A., Camacho, M., Guerra, H., Swings, J. & Portaels, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agent Chemother.* **46**, 2720 -

- 2722, doi:10.1128/AAC.46.8.2720-2722.2002 (2002).
- 52 Rodríguez, A., Villegas, E., Satake, H., Possani, L. D. & Corzo, G. Amino acid substitutions in an alpha-helical antimicrobial arachnid peptide affect its chemical properties and biological activity towards pathogenic bacteria but improves its therapeutic index. *Amino Acids* **40**, 61 - 68, doi:10.1007/s00726-009-0449-y (2011).
- 53 Wuyts, A., Menten, P., Osselaer, N. V. & Damme, J. V. Assays for chemotaxis. *Method. Mol. Biol.* **249**, 135 - 151, doi:10.1385/1-59259-667-3:135 (2008).
- 54 LaVallie, E. R. & Riggs, P. Enzymatic and chemical cleavage of fusion proteins. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **28**, 16.04.05 - 16.04.17 (1994).
- 55 Tabor, S. Expression using the t7 RNA polymerase/promoter system. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **11**, 16.12.11 - 16.12.11 (1990).
- 56 Islam, R. S., Tisi, D., Levy, M. S. & Lye, G. J. Framework for the rapid optimization of soluble protein expression in *Escherichia coli* combining microscale experiments and statistical experimental design. *Biotechnol. Prog.* **23**, 785 - 793, doi:10.1021/bp070059a (2007).
- 57 Jana, S. & Deb, J. K. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**, 289 - 298, doi:10.1007/s00253-004-1814-0 (2005).
- 58 Makrides, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **60**, 512 - 538 (1996).
- 59 Huang, L., Ching, C. B., Jiang, R. & Leong, S. S. J. Production of bioactive human β -defensin 5 and 6 in *Escherichia coli* by soluble fusion expression. *Protein Expr. Purif.* **61**, 168 - 174, doi:10.1016/j.pep.2008.05.016 (2008).
- 60 Huang, L., Leong, S. S. J. & Jiang, R. Soluble fusion expression and characterization of bioactive human β -defensin 26 and 27. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **84**, 301 - 308, doi:10.1007/s00253-009-1982-z (2009).
- 61 Yan, X., Zhong, J., Liu, H., Liu, C., Zhang, K. & Lai, R. The cathelicidin-like peptide derived from panda genome is a potential antimicrobial peptide. *Gene* **492**, 368 - 374, doi:10.1016/j.gene.2011.11.009 (2012).
- 62 Peng, L., Xu, Z., Fang, X., Wang, F. & Cen, P. High-level expression of soluble human β -defensin-2 in *Escherichia coli*. *Process Biochem.* **39** 2199-2205, doi:10.1016/j.procbio.2003.11.011 (2004).
- 63 Zorko, M., Japel, B., Hafner-Bratkovič, I. & Jerala, R. Expression, purification and structural studies of a short antimicrobial peptide. *Biochem. Biophys. Acta.* **1788**, 314 - 323, doi:10.1006/bbrc.1998.8848 (2009).
- 64 Li, Y. Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: a review. *Protein Expr. Purif.* **80**, 260 - 267, doi:10.1016/j.pep.2011.08.001 (2011).
- 65 Kane, J. F. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 494 - 500, doi:10.1016/0958-1669(95)80082-4 (1995).
- 66 Burgess-Brown, N. A., Sharma, S., Sobott, F., Loenarz, C., Oppermann, U. & Gileadi, O. Codon optimization can improve expression of human genes in *Escherichia coli*: a multi-gene study. *Protein Expr. Purif.* **59**, 94 - 102, doi:10.1016/j.pep.2008.01.008 (2008).
- 67 Glick, B. R. & Whitney, G. K. Factors affecting the expression of foreign proteins in *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol.* **1**, 277 - 282, doi:10.1007/BF01569305 (1987).
- 68 Peng, L., Xu, Z., Fang, X., Wang, F., Yang, S. & Cen, P. Preferential codons enhancing the expression level of human β -defensin-2 in recombinant *Escherichia coli*. *Protein Pept. Lett.* **11**, 339-344, doi:10.2174/0929866043406760 (2004).
- 69 Esposito, D. & Chatterjee, D. K. Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**, 353 - 358,

- doi:10.1016/j.copbio.2006.06.003 (2006).
- 70 Cipáková, I., Hostinová, E., Gasperík, J. & Velebný, V. High-level expression and purification of a recombinant hBD-1 fused to LMM protein in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **37**, 207 -212, doi:10.1016/j.pep.2004.04.024 (2004).
- 71 Vargues, T. *et al.* Efficient production of human β -defensin 2 (hBD2) in *Escherichia coli*. *Protein Pept. Lett.* **16**, 668 - 676, doi:10.2174/092986609788490122 (2009).
- 72 Wang, F., Fang, X., Xu, Z., Peng, L. & Cen, P. Fusion expression of human β -defensin-2 from multiple joined genes in *Escherichia coli*. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **34**, 215 - 225, doi:10.1081/PB-200026797 (2004).
- 73 Li-gang, S., Xi-cheng, L., You-yong, L., Gen-yu, W. & Wen-mei, L. Soluble expression of active human β -defensin-3 in *Escherichia coli* and its effects on the growth of host cells. *Chin. Med. J.* **120**, 708 - 713 (2007).
- 74 Pazgier, M. & Lubkowski, J. Expression and purification of recombinant human alpha-defensins in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **49**, 1 - 8, doi:10.1016/j.pep.2006.05.004 (2006).
- 75 Bommarius, B., Jenssen, H., Elliott, M., Kindrachuk, J., Pasupuleti, M., Gieren, H., Jaeger, K.-E., Hancock, R. E. W. & Kalman, D. Cost-effective expression and purification of antimicrobial and host defense peptides in *Escherichia coli*. *Pept.* **31**, 1957 - 1965, doi:10.1016/j.peptides.2010.08.008 (2010).
- 76 Zhang, L., Falla, T., Wu, M., Fidai, S., Burian, J., Kay, W. & Hancock, R. E. W. Determinants of recombinant production of antimicrobial cationic peptides and creation of peptide variants in bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**, 674 - 680, doi:10.1006/bbrc.1998.8848 (1998).
- 77 Jang, S. A., Sung, B. H., Cho, J. H. & Kim, S. C. Direct expression of antimicrobial peptides in an intact form by a translationally coupled two-cistron expression system. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 3980 - 3986, doi:10.1128/AEM.02753-08 (2009).
- 78 Campopiano, D. J., Clarke, D. J., Polfer, N. C., Barran, P. E., Langley, R. J., Govan, J. R. W., Maxwell, A. & Dorin, J. R. Structure-activity relationships in defensin dimers. A novel link between β -defensin tertiary structure and antimicrobial activity. *J. Biol. Chem.* **279**, 48671 - 48679, doi:10.1074/jbc.M404690200 (2004).
- 79 Klüver, E., Schulz-Maronde, S., Scheid, S., Meyer, B., Forssmann, W.-G. & Adermann, K. Structure-activity relation of human β -defensin 3: influence of disulfide bonds and cysteine substitution on antimicrobial activity and cytotoxicity. *Biochem.* **44**, 9804 - 9816, doi:10.1021/bi050272k (2005).
- 80 Zhong, Z., Xu, Z., Peng, L., Huang, L., Fang, X. & Cen, P. Tandem repeat mhbd2 gene enhance the soluble fusion expression of hBD2 in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**, 661 - 667, doi:10.1007/s00253-005-0212-6 (2006).
- 81 Franco, O. L. Peptide promiscuity: an evolutionary concept for plant defense. *Fed. Eur. Biochem. Soc.* **585**, 995 - 1000, doi:10.1016/j.febslet.2011.03.008 (2011).
- 82 Kim, Y. S. & Cha, H. J. Disperse distribution of cationic amino acids on hydrophilic surface of helical wheel enhances antimicrobial peptide activity. *Biotechnol. Bioeng.* **107**, 216 - 223, doi:doi:10.1002/bit.22810 (2010).
- 83 Grimsley, G. R. & Pace, N. Spectrophotometric determination of protein concentration. *Curr. Protoc. Protein Sci.*, 3.1.1. - 3.1.9. (2003).
- 84 Pace, N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* **4**, 2411 - 2423, doi:10.1002/pro.5560041120 (1995).
- 85 García, J.-R. C. *et al.* Identification of a novel, multifunctional β -defensin (human β -defensin 3) with specific antimicrobial activity. *Cell Tissue Res.* **306**, 257 - 264, doi:10.1007/s004410100433 (2001).

- 86 Singh, P. K. *et al.* Production of β -defensins by human airway epithelia. *PNAS* **95**, 14961 - 14966, doi:10.1073/pnas.95.25.14961 (1998).
- 87 Huang, L., Wang, J., Zhong, Z., Peng, L., Chen, H., Xu, Z. & Cen, P. Production of bioactive human β -defensin-3 in *Escherichia coli* by soluble fusion expression. *Biotechnol. Lett.* **28**, 627 - 632, doi:10.1007/s10529-006-0024-5 (2006).
- 88 Rastogi, N., Labrousse, V. & Goh, K. S. In vitro activities of fourteen antimicrobial agents against drug susceptible and resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and comparative intracellular activities against the virulent H37Rv strain in human macrophages. *Curr. Microbiol.* **33**, 167 - 175, doi:10.1007/s002849900095 (1996).
- 89 Rivas-Santiago, B., Schwander, S. K., Sarabia, C., Diamond, G., Klein-Patel, M. E., Hernandez-Pando, R., Ellner, J. J. & Sada, E. Human β -defensin 2 is expressed and associated with *Mycobacterium tuberculosis* during infection of human alveolar epithelial cells. *Infect. Immun.* **73**, 4505 - 4511, doi:10.1128/IAI.73.8.4505-4511.2005 (2005).
- 90 Kapoor, R., Eimerman, P. R., Hardy, J. W., Cirillo, J. D., Contag, C. H. & Barron, A. E. Efficacy of antimicrobial peptoids against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agent Chemother.* **55**, 3058 - 3062, doi:10.1128/AAC.01667-10 (2011).
- 91 Lemus, D., Montoro, E., Echemendía, M., Yzquierdo, S. L., Martín, A., Portaels, F. & Palomino, J. C. Nuevos métodos para la detección rápida de la resistencia de *Micobacterium tuberculosis*. *Biotecnol. Apl.* **22**, 306 - 308 (2005).
- 92 Fjell, C. D., Hiss, J. A., Hancock, R. E. W. & Schneider, G. Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 37 - 51, doi:doi:10.1038/nrd3591 (2012).
- 93 Chou, H.-T., Wen, H.-W., Kuo, T.-Y., Lin, C.-C. & Chen, W.-J. Interaction of cationic antimicrobial peptides with phospholipid vesicles and their antibacterial activity. *Pept.* **31**, 1811 - 1820, doi:10.1016/j.peptides.2010.06.021 (2010).
- 94 Corrales-García, L. L., Possani, L. D. & Corzo, G. Expression systems of human β -defensins: vectors, purification and biological activities. *Amino Acids* **40**, 5 - 13, doi:10.1007/s00726-010-0493-7 (2011).

ANEXOS

Anexo 1: Expresión y purificación de β -defensinas recombinantes en los plásmidos pQE40, pET32a(+) y pET22b(+)

A.1.1 Expresión y purificación de pQE40::HBD3

El plásmido pQE40 (QiaGen) es un vector que confiere resistencia a ampicilina y cuya organización en el extremo 5', en la región concerniente a la expresión, está diseñado de la siguiente manera: un promotor T5/*lac*, dos sitios para unión del represor (Operador Lac), sitio de unión del ribosoma, codón de inicio (ATG), una región que codifica para una etiqueta de 6 histidinas, la secuencia que codifica para la proteína de fusión dihidro-folato reductasa (DHFR), sitio de clonación múltiple y codones de término. Para la construcción del plásmido de expresión, éste se sometió a restricción con las enzimas *Bgl*II y *Pst*I. El vector lineal se llevó a reacción de ligación con el inserto proveniente de la construcción pKS::HBD3(pQE40), previamente digerido con la mismas enzimas de restricción. A partir del producto de ligación se procedió a realizar transformación en células *E. coli* XL1-Blue y con algunas de las clonas obtenidas se realizó PCR de colonia (oligonucleótidos pQE Tabla 9). Aquellas clonas que mostraran un inserto de tamaño esperado (911 pb) se enviaron a secuenciar (Figura A-1).

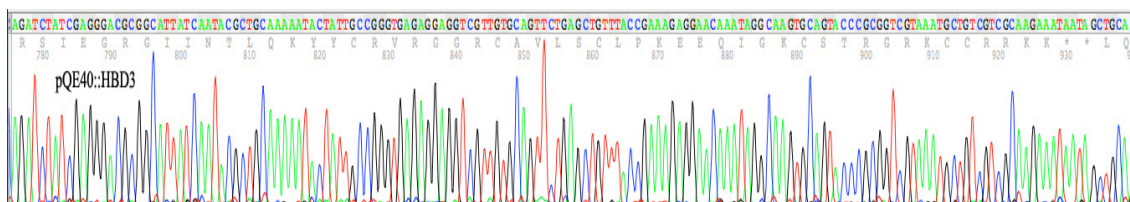


Figura A- 1. Secuencia de HBD3 en el plásmido pQE40. Secuencia en donde se aprecia en el extremo 5' el sitio de reconocimiento de *Bgl*II (AGATCT) y el sitio de corte del factor Xa (aminoácidos IEGR), el péptido HBD3. En el extremo 3' se observan dos codones de paro (mostrados como asteriscos) y el sitio de restricción de *Pst*I (CTGCAG).

El plásmido recombinante pQE40::HBD3 con secuencia corroborada, fue transformado en la célula *E. coli* M15 [pREP4] y sembrado en medio sólido 2xYT suplementado con 200 μ g/mL de ampicilina y 30 μ g/mL de kanamicina. La expresión en 500 mL de medio líquido 2xYT y con los mismos antibióticos, se hizo a 37 °C y 180 rpm; cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica celular de 0.6 U, se indujo la expresión del péptido con 1mM de IPTG y se dejó incubar durante 6 horas a 29 °C y 180 rpm. Se encontró que la expresión de HBD3 acoplada a la proteína de fusión DHFR estaba presente como cuerpos de inclusión en la fracción insoluble (Figura 2-A), que posteriormente se solubilizó con GndHCl (6 M). A continuación el péptido se purificó por columna de afinidad IMAC-NiNTA, de donde se eluyeron 6 fracciones que se redujeron con DTT 100 mM y se incubó

durante 1 hora a 55°C para luego ser purificadas por RP-HPLC, inicialmente preparativo y finalmente analítico (los procedimientos se describen en los apartados 6.7 y 6.9). Después de los procesos de purificación se logró obtener una fracción mayoritaria en el cromatograma, y que en un gel de Tricina-SDS-PAGE se constató como una banda única y con el peso molecular esperado (Figura A-2). Luego de la purificación (Figura A-3), el rendimiento obtenido fue de 1.6 mg de proteína por litro de cultivo celular. Considerando que la HBD3 representa el 19.6 % de la proteína total, se recuperarían en teoría 0.32 mg/L de HBD3, sin tener en cuenta las pérdidas por corte y repurificación, por lo que se decidió no considerar ésta construcción como apta para los procesos subsiguientes de evaluaciones biológicas.

En cuanto a la construcción del plásmido de expresión pQE40::HBD2, debe registrarse que no pudo lograrse su detección ni en geles de poliacrilamida ni en inmuno-*blot*.

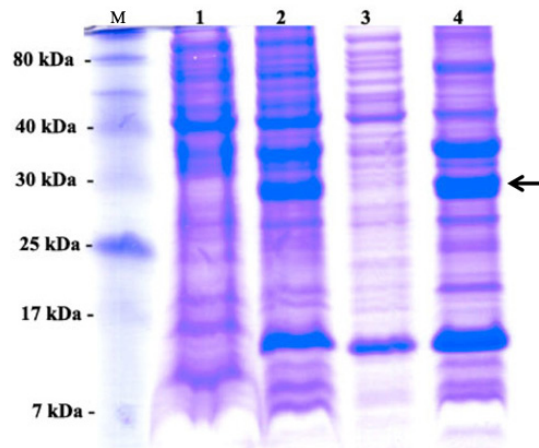


Figura A- 2. Expresión de HBD3 en el plásmido pQE40. Líneas: M-marcador de peso molecular; 1-Cultivo antes de la inducción; 2-Cultivo al final de la inducción; 3-Fracción soluble; 4-Fracción insoluble. La flecha señala el péptido heterólogo HBD3 unido a la proteína de fusión DHFR con un peso molecular de aproximadamente 29 kDa.

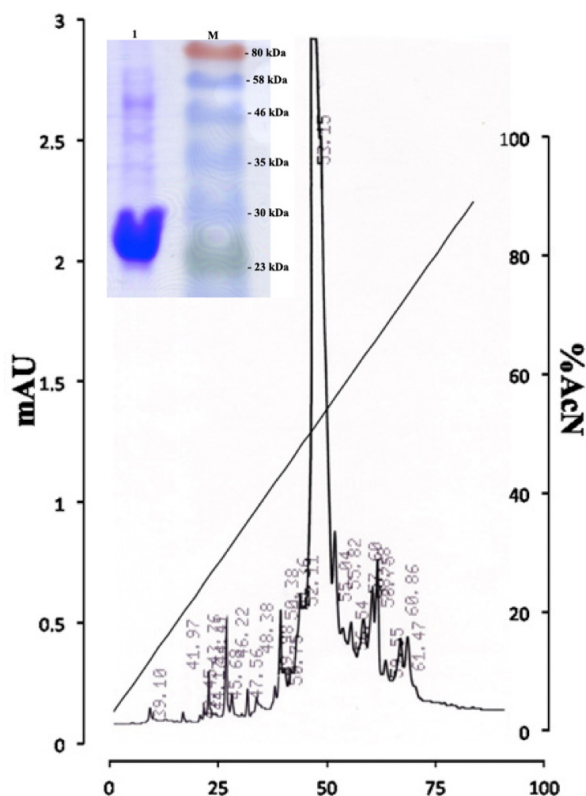


Figura A- 3. Purificación de HBD3 unida a la proteína de fusión DHFR. Cromatograma con una fracción mayoritaria obtenida en un tiempo de retención de 53.15 min (53 % de acetonitrilo). El inserto es un gel Tricina-SDS-PAGE que en la línea 1 muestra 5 μ g provenientes de la fracción de 53.13 min y que indica un peso molecular aparente de aproximadamente 29 kDa.

A.1.2 Expresión y purificación de HBD2 y HBD3 expresados en pET32a

Las células hospederas *E. coli* BL21 (DE3) quimiocompetentes se transformaron, con los plásmidos de expresión pET32a::HBD2 y pET32a::HBD3, que además de contener la secuencia que codifica para la defensina humana, antecedida por la etiqueta de histidinas, también tiene una secuencia para la expresar la proteína de fusión tiorredoxina (Trx), ambas proteínas bajo control del promotor T7. El plásmido además confiere a la cepa hospedera, resistencia a ampicilina. La expresión se llevó a cabo en 500 mL de medio líquido 2xYT en presencia del antibiótico en concentración de 200 μ g/mL. El crecimiento celular se realizó a 37 °C y 180 rpm y cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de aproximadamente 0.8 U se procedió a hacer la inducción con IPTG en una concentración final de 1 mM y se incubó el cultivo durante 6 horas a 30 °C y 180 rpm. En el momento de hacer el análisis de la presencia de la proteína recombinante en las diferentes fracciones celulares, la proteína expresada se encontró tanto en la fracción insoluble como en la fracción soluble citoplasmática. Las proteínas expresadas, unidas a la proteína de fusión, mostraron masas moleculares aparentes en la migración en el gel de electroforesis, semejantes a las esperadas según los valores teóricos calculados (Tabla 14 y Figura A-4): 17.9 kDa para Trx-HBD2; 18.7 kDa para Trx-HBD3. Se observó que las muestras pertenecientes a las fracciones solubles se agregaban y precipitaban por lo que fue necesario tratarlas de la misma manera que la fracción insoluble; esto es, solubilizarlas con

GndHCl (apartado 6.7), y posteriormente purificarlas por columna de afinidad, IMAC-NiNTA. Las fracciones obtenidas mediante la purificación por afinidad se sometieron a un proceso de reducción con 100 mM de DTT y se incubaron durante 1 hora a 55 °C. A continuación cada fracción se purificó por RP-HPLC, inicialmente en una columna semipreparativa y finalmente en una columna analítica. Al final de los diferentes procesos de purificación y concentración del producto final, se llegaron a tener rendimientos de 3.2 mg/L y 2.5 mg/L de Trx-HBD3 y Trx-HBD2, respectivamente.

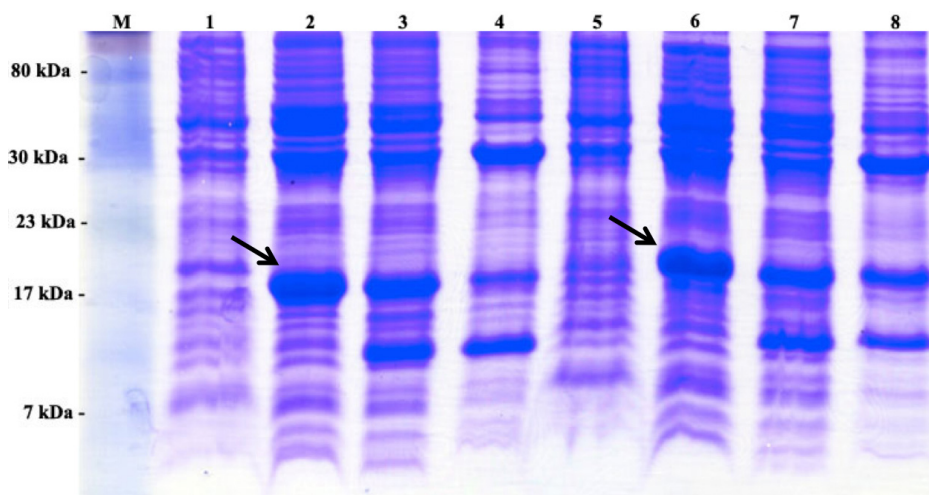


Figura A- 4. Expresión de HBD3 y HBD2 en el plásmido pET32a. Trx-HBD2: líneas 1 a 4; Trx-HBD3: Líneas: 5 a 8. Líneas 1 y 5: células sin inducir. Líneas 2 y 6: células al final de la inducción. Líneas 3 y 7: fracción soluble. Líneas 4 y 8: fracción insoluble. Las flechas indican la presencia del péptido en la masa molecular aparente correspondiente a la teórica: Trx-HBD2: 17.9 kDa y Trx-HBD3: 18.7 kDa.

La purificación de HBD3 unida a Trx en columna de RP-HPLC analítico, mostró un patrón cromatográfico en el que se identifica una fracción mayoritaria con un tiempo de retención de 53.4 minutos (Figura A-5A). La proteína Trx-HBD2 purificada por RP-HPLC analítico dio como resultado que mostraba una fracción mayoritaria en un tiempo de 56 minutos (Figura A-5B).

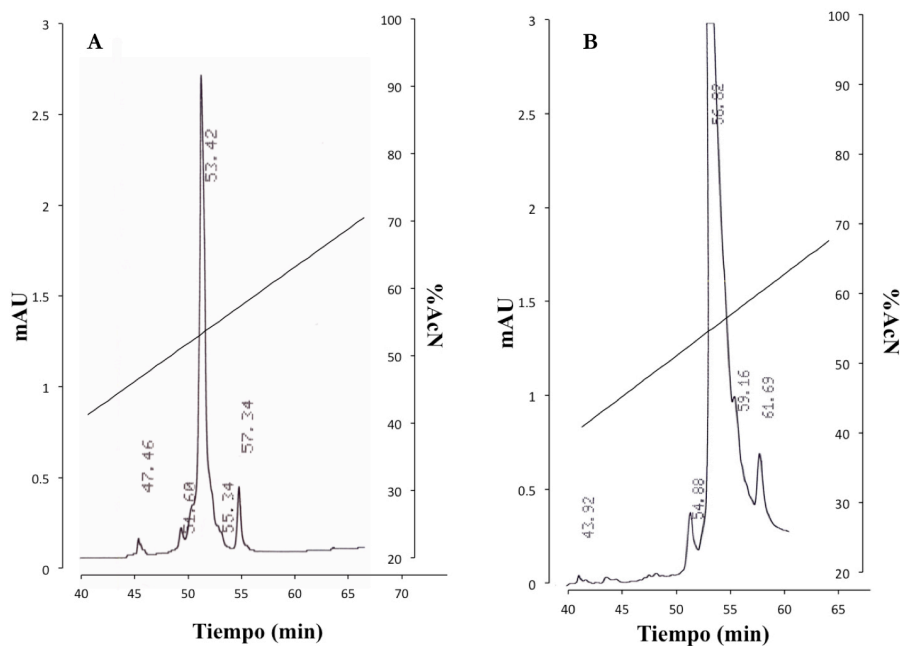


Figura A- 5. Purificación de β -defensinas humanas unidas a Trx. A-Cromatograma producto de purificación de Trx-HBD3 por RP-HPLC analítico en columna C_{18} (0 a 70% de AcN en 70 minutos). B- Cromatograma producto de purificación de Trx-HBD2 por RP-HPLC analítico en columna C_{18} (0 a 70% de AcN en 70 minutos).

Una porción pura de cada una de las fracciones mayoritarias ($\sim 200 \mu\text{g}$), se sometió a proceso de plegamiento y posteriormente a corte con la proteasa Factor Xa (1 μg de Factor Xa corta $\sim 50 \mu\text{g}$ de proteína). Pasado el tiempo de reacción de la proteólisis (24 horas) se procedió a purificar la muestra de reacción por RP-HPLC y se recolectaron varias fracciones cuyas masas moleculares se analizaron por ESI-MS. Los resultados del corte de Trx-HBD3 muestran un corte inespecífico, con gran cantidad de fracciones pequeñas, que no permiten obtener ninguna masa coincidente con el producto buscado y tampoco a una conclusión válida que permitiera continuar con el proceso. Por otro lado, la reacción de corte de Trx-HBD2, mostró varias fracciones, inclusive una que correspondería al péptido sin cortar, pero la fracción con un tiempo de retención de 42.6 minutos (Figura A-6A), al evaluarla por ESI-MS presentó una masa molecular semejante a la del péptido maduro de HBD2 (4,334.2 kDa) (Figura A-6B).

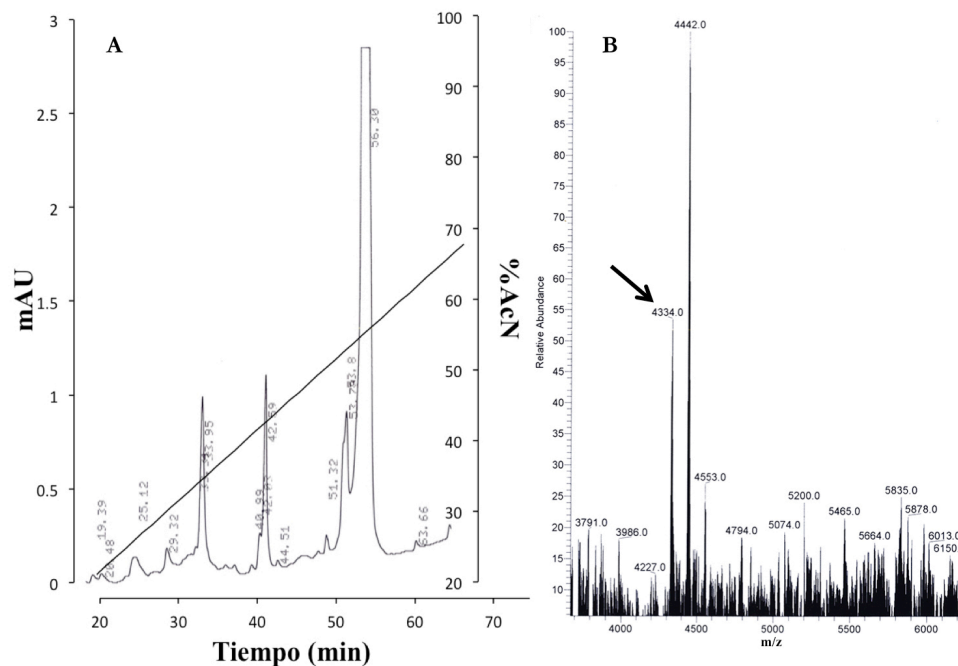


Figura A- 6. Cromatograma y espectro de masas del corte de Trx-HBD2 con Factor Xa. A- El cromatograma corresponde a la purificación de 200 μ g de péptido Trx-HBD2 que se sometió a plegamiento. Se observan varias fracciones, entre ellas la del tiempo de retención 56.3 que y a corte enzimático con el Factor Xa. (Condiciones del RP-HPLC columna C_{18} analítica: 0 a 70% de AcN en 70 minutos). B- La flecha indica la presencia de un péptido con la masa molecular correspondiente a HBD2 (4,334.2 kDa).

Los resultados obtenidos en los procesos de expresión y purificación de Trx-HBDs no fueron contundentes para continuar con este sistema de expresión. Por una parte su rendimiento en masa no fue significativo, considerando que el péptido maduro de cualquiera de las defensinas, representa aproximadamente el 20% del péptido total y además al momento de hacer la separación de la proteína de fusión Trx del péptido HBD, nos encontramos con que existe una degradación total de la HBD3 y un muy bajo rendimiento de HBD2. Por otra parte el procedimiento de expresión fue muy demandante con respecto a los rendimientos y purzas obtenidos. Finalmente, se concluyó que éstos vectores de expresión no permitirían obtener material suficiente para llevar a cabo los ensayos biológicos necesarios.

A.1.3 Expresión pET22b::HBD2 y pET22b::HBD3

La expresión de las defensinas humanas HBD2 y HBD3, clonadas en el plásmido pET22b, se probaron en las cepas hospederas *E. coli* BL21 DE3 y *E. coli* C41 DE3. Con la construcción realizada, se esperaba encontrar la expresión de proteínas de aproximadamente 6.6 kDa y 7.4 kDa para HBD2 y HBD3 respectivamente, que de acuerdo a nuestro diseño, contenían las secuencias de reconocimiento para Factor Xa, etiqueta de histidinas y péptido maduro de cada una de las defensinas (Tabla 14).

Los plásmidos recombinantes, pET22b::HBD2 y pET22b::HBD3, de secuencia corroborada y transformados en las células hospederas mencionadas anteriormente, se

usaron para hacer ensayos de expresión. Las condiciones de cultivo fueron 50 ml de medio de cultivo, 37 °C y 180 rpm, la inducción con 1 mM de IPTG se hizo en el momento en que el cultivo alcanzó una densidad óptica celular de 0.6 U, se incubó durante 6 horas, 22 °C y 120 rpm. Debido a que el plásmido pET22b se diseñó de manera que las proteínas allí expresadas fueran enviadas al periplasma celular, los cultivos fueron tratados siguiendo los lineamientos de péptidos presentes en el periplasma (apartado 6.8). Las diferentes fracciones obtenidas al final del proceso de extracción, se analizaron en un gel de Tricina SDS-PAGE y inmuno-Blot (Anticuerpo Anti-Histidinas). La expresión en el gel no pudo ser detectada con claridad, aunque en el revelado del inmuno-*blot* las proteínas sí estuvieron presentes (Figura A-7).

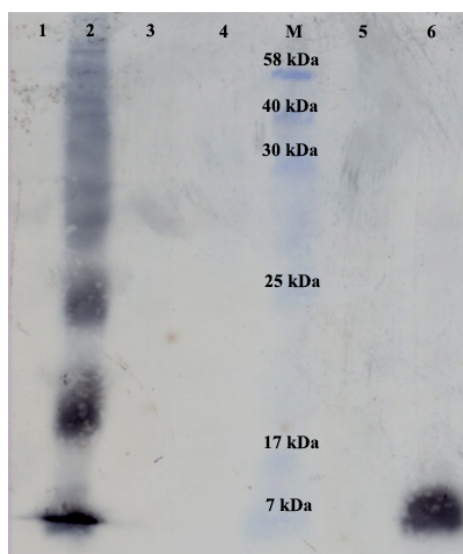


Figura A- 7. Inmuno-*blot* de la expresión de pET22b::HBD2 y pET22b::HBD3. *E. coli* BL21/ pET22b::HBD3, líneas 1-Antes de inducir y 2-Después de inducir. *E. coli* C41/ pET22b::HBD3, líneas 3-Antes de inducir y 4-Después de inducir. *E. coli* BL21/ pET22b::HBD2, líneas 5-Antes de inducir y 6-Después de inducir. M-marcador de peso molecular.

Estos sistemas de expresión generaron cantidades muy bajas de proteína heteróloga, por lo tanto no se consideró purificarlas o usarlas en ensayos biológicos. La cepa hospedera *E. coli* C41 DE3 (Figura 6-A, líneas 5 y 6), no mostró capacidad alguna para expresar los péptidos antimicrobianos tipo defensinas en este trabajo, contrario a los resultados obtenidos con la misma cepa cuando expresaron péptidos potencialmente tóxicos para *E. coli*¹.

Anexo 2: Resultados de los plegamientos de las defensinas β -humanas expresadas en la investigación

El plegamiento en las defensinas humanas recombinantes obtenidas, se realizó *in vitro* bajo condiciones controladas, y dio como resultado los espectros masas que se presentan a continuación y que demuestran la coherencia entre los valores teóricos y experimentales de oxidación de todas y cada una de las proteínas expresadas en esta investigación.

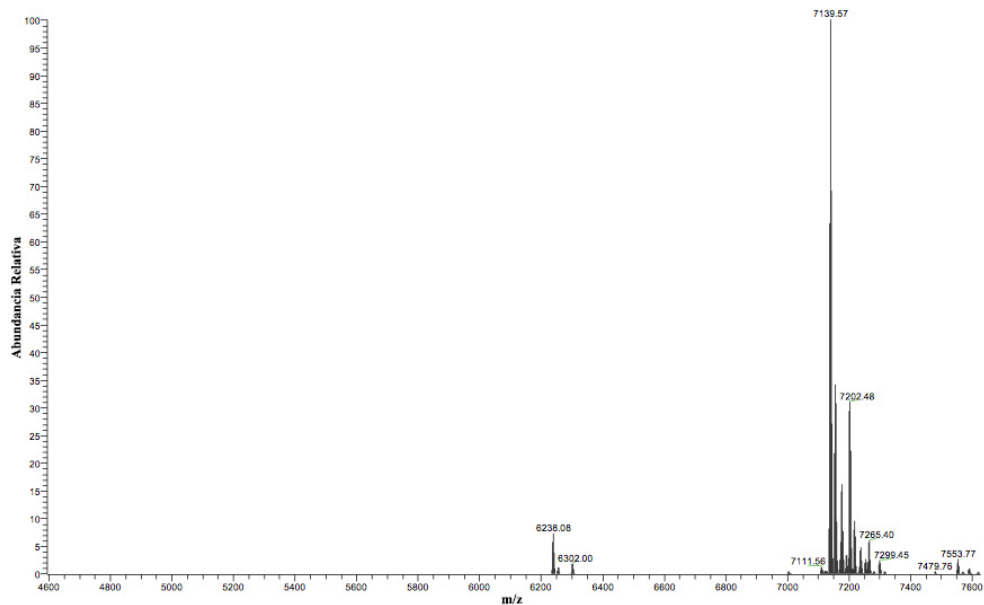


Figura A- 8. Masa molecular de HBD3M oxidada

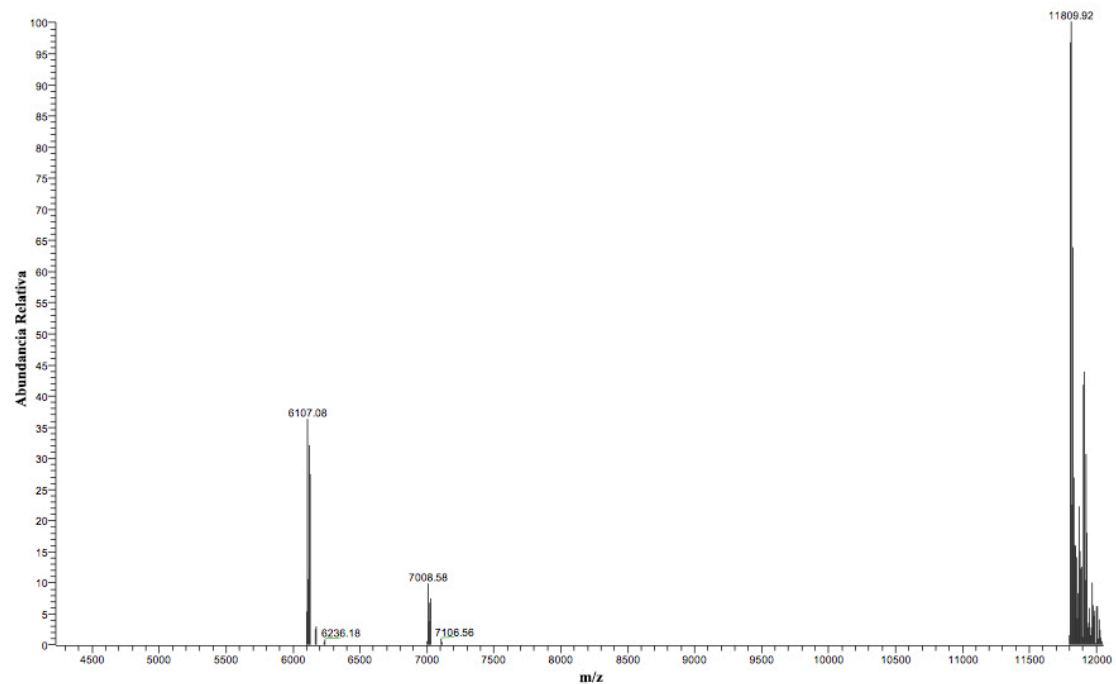


Figura A- 9. Masa molecular de HBD3M-HBD2 oxidada

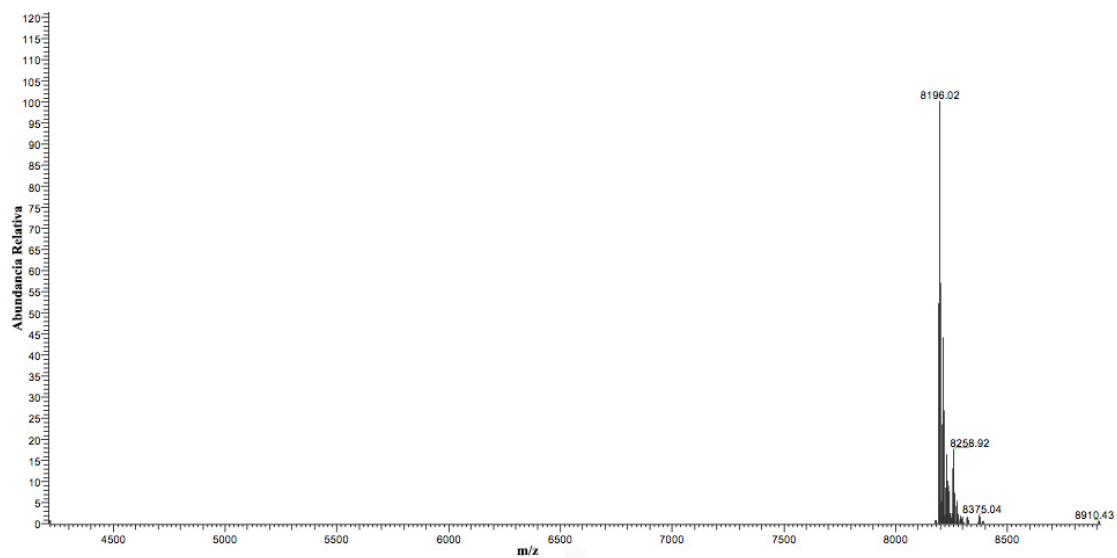


Figura A- 10. Masa molecular de HBD2 oxidada

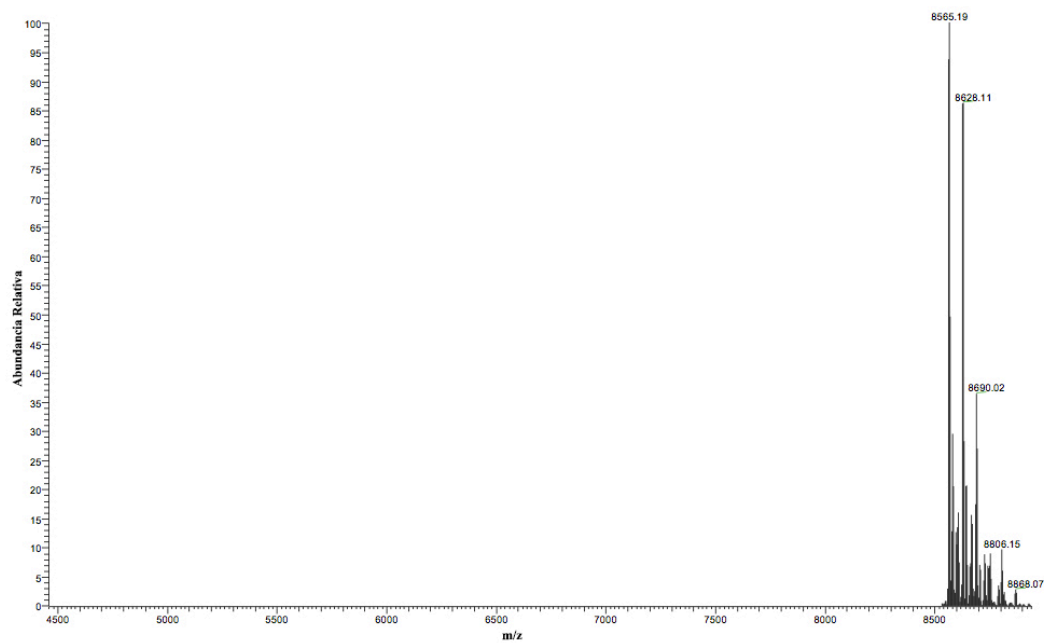


Figura A- 11. Masa molecular de HBD2-KLK oxidada

Anexo 3: Diseño experimental para mejorar la expresión de HBD2

En la era pre-genómica, la producción de proteínas se realizaba por el método de ensayo y error. Éste método además de ser realizado a mano, solo evaluaba un parámetro a la vez, haciendo el proceso muy prolongado y costoso². Debido al bajo nivel de expresión del HBD2 en el plásmido pET28a(+), se decidió plantear un diseño de experimentos que pudiera conducir a la obtención de suficiente material peptídico para efectuar los diferentes análisis biológicos.

La expresión de HBD2, clonada en el plásmido pET28a(+) y transformado en la cepa de expresión *E. coli* BL21 DE3, se evaluó usando un análisis factorial completo (2^k) en el que se combinaron 4 factores, 2 niveles en cada factor, tres puntos al centro, para un total de 19 experimentos. Los factores y niveles evaluados fueron:

- Concentración celular en la que se procede a la inducción (0.4 U y 1.0 U de densidad óptica medida a 600 nm)
- Temperatura a que se hace la inducción (20 y 30 °C)
- Concentración del inductor (0.1 y 1 mM de IPTG)
- Duración de la incubación en condiciones de inducción (4 y 12 horas)

Para la determinación de la mejor condición de expresión se establecieron las siguientes variables respuesta:

- Biomasa en peso seco (por medio de la ecuación: g/L biomasa = 0.37*Abs(600nm) para la cepa *E. coli* BL21 (DE3).
- Cantidad de proteína total (determinada por BCA Protein Assay Reagent (Bicinchoninic acid, Thermo Scientific Pierce; y BSA como proteína estándar para la determinación de la curva patrón).
- Cantidad de péptido heterólogo de interés (el análisis de la expresión de proteína de heteróloga se hizo en los geles de Tricina-SDS-PAGE (tinción Coomassie), y las bandas se cuantificaron y analizaron por medio de imágenes de los geles usando el equipo ChemiDoc (BioRad: software ImageLab). La presencia del péptido heterólogo se corroboró por análisis de inmuno-*blot*.

La combinatoria de los experimentos (Figura A-12) y el análisis de los resultados se realizó bajo el software Design Expert 5 (Stat-Ease Corporation, Minneapolis, USA).

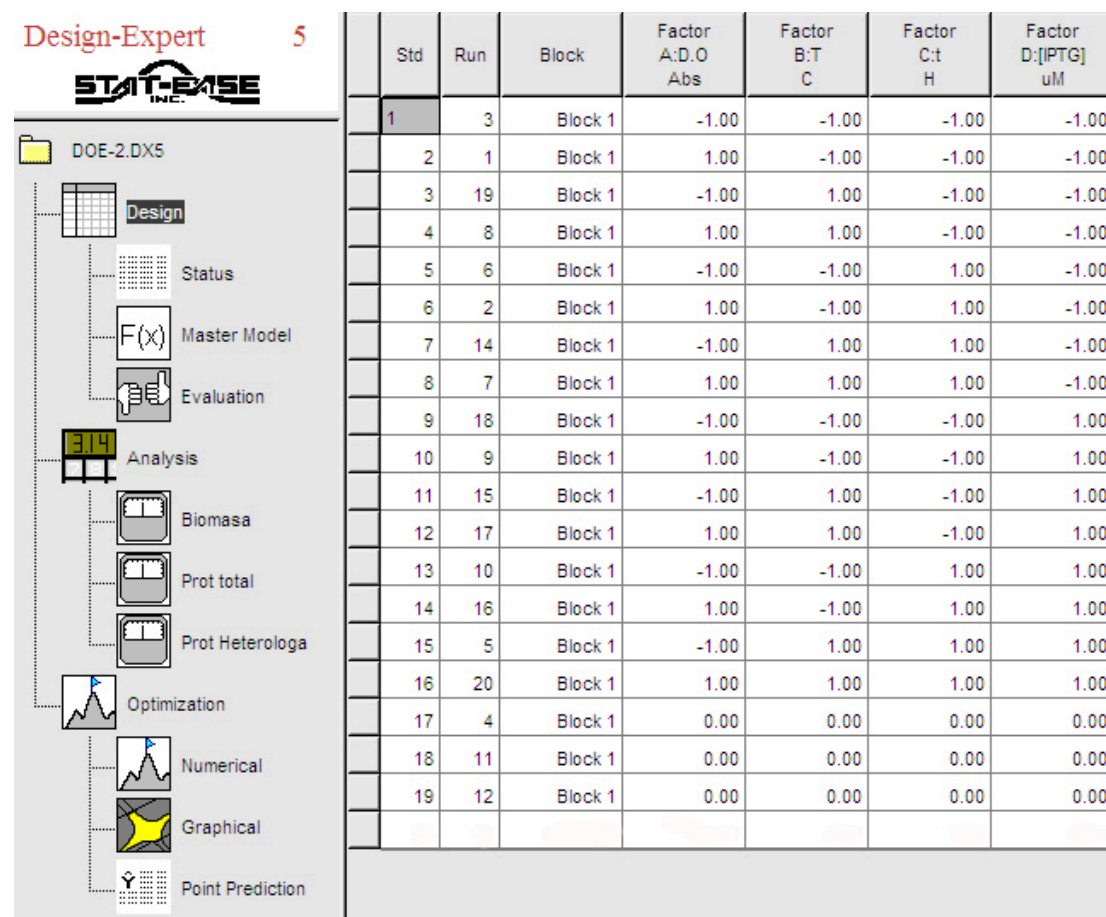


Figura A- 12. Combinatoria de factores y niveles del diseño experimental. Factores: A: D.O., densidad óptica de inducción (Abs: Absorbancia); B: T, temperatura de inducción (C en °C); t, tiempo de inicio de la inducción (H: tiempo en horas); D: [IPTG], concentración del inductor (uM: concentración micro-Molar). “-1 y 1” indican el menor y el mayor valor de nivel para cada factor. “0” indica el valor medio para cada nivel. El orden estándar es establecido por el paquete estadístico.

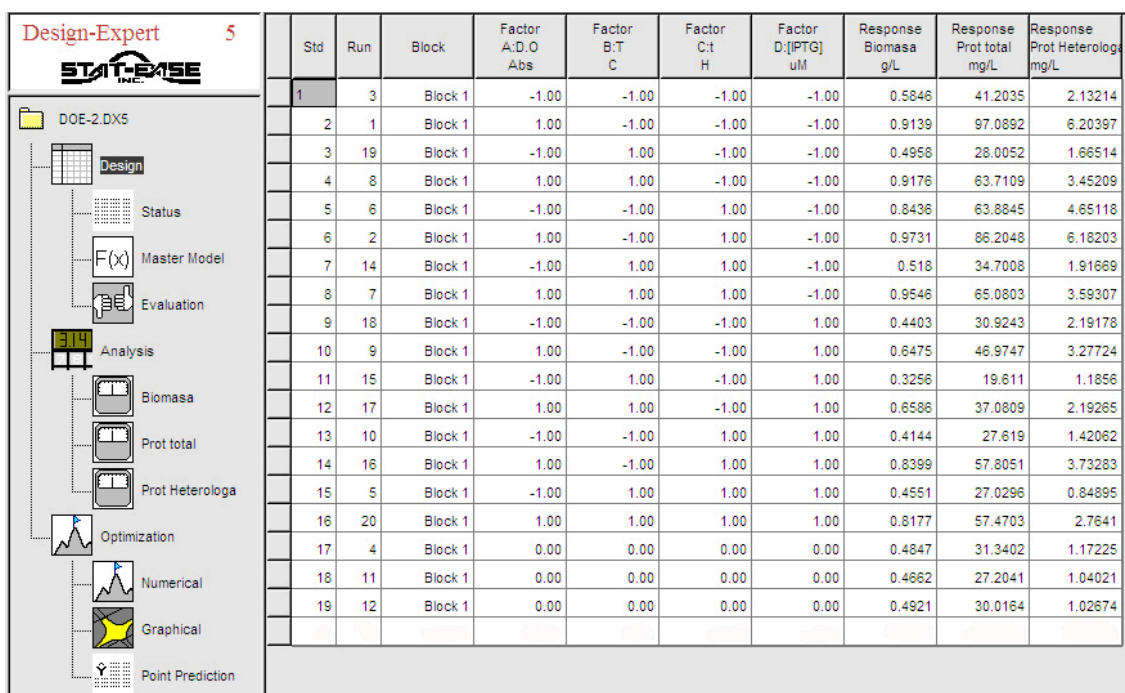
Las expresiones se evaluaron en escala analítica con un volumen de trabajo de 50 mL en matraces de 250 mL. Usando un cultivo previo de 12 horas de crecimiento que se inoculaban los matraces de trabajo para obtener una densidad óptica inicial de 0.03 U de absorbancia medidas a 600 nm. Cada uno de los cultivos comenzaba con una incubación a 37 °C y a una agitación constante de 180 rpm. Teniendo en cuenta la combinatoria experimental arrojada por el paquete estadístico, el cultivo se dejaba crecer hasta la densidad óptica indicada y en ese momento se procedía a adicionar el inductor (mayor o menor nivel según el plan experimental). Inmediatamente se ajustaba la temperatura de inducción y se incubaba el tiempo requerido según el diseño experimental, sin modificar la velocidad de agitación. Al finalizar el tiempo de inducción, se determinaba la concentración celular por densidad óptica, se procedía a recolectar las células por centrifugación (7,000 g durante 45 minutos) y se almacenaban en congelación (-20 °C). Para el análisis de los resultados se tomó 1 mL de muestra antes y al final del proceso de inducción. La muestra se centrifugó a 10,000 g durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se reservó para las diferentes pruebas. Se realizaron dos réplicas del experimento.

A cada una de las muestras de los diferentes experimentos se les determinó la concentración de proteína total por el método de BCA. Se realizaron los geles de Tricina-SDS-PAGE en los que se cargaba una cantidad de proteína total igual para todos los pozos. Luego de tinción con Coomassie y destinción del gel, se analizaba la imagen del gel, generada por el equipo ChemiDoc y el software Image-Lab, que permitió calcular la concentración del péptido de interés en relación con la proteína total cargada en el gel. Todos éstos datos se introdujeron en la matriz combinatoria que arrojó el programa Design-Expert 5 y se procedió a determinar cuál era la mejor condición de cultivo en la que se pudiera obtener la mayor cantidad de péptido heterólogo.

El diseño de experimentos tipo factorial es una combinación en la que se analizan algunas variables que se evalúan en diferentes niveles². Actualmente, el diseño de experimentos están teniendo acogida en los procesos de investigación en los que se considera la expresión heteróloga de péptidos, puesto que pueden proveer información valiosa referente a la interacción entre variables, a diferencia del método convencional en el que solo se analiza un factor a la vez³ y en el que se asume que los factores son mutuamente independientes. El diseño de experimentos (DoE) es una aproximación para la determinación matemática de la relación entre múltiples factores que afectan los procesos, además permite la visualizar las interacciones entre las diferentes variables experimentales, y proporciona una predicción más confiable de los niveles de expresión de proteínas en regiones no cubiertas explícitamente por la experimentación.

La expresión de HBD2 comenzó a hacerse de manera semejante a las expresiones de HBD3, HBD3-M y HBD3-M-HBD2, pero con resultados que no permitían obtener el suficiente material para continuar con las pruebas biológicas. Las condiciones de expresión iniciales fueron: 0.8 U de densidad óptica del cultivo para realizar la inducción, 1 mM de IPTG, 30 °C para la incubación después de la inducción durante 8 horas. Siguiendo éstas condiciones se llegaron a obtener 0.8 mg/L de HBD2. Se decidió entonces realizar un diseño experimental que permitiera llegar a obtener una mayor expresión del péptido recombinante. Se realizó un diseño con cuatro factores (D.O. de inducción, concentración del inductor, tiempo y temperatura de inducción) y dos niveles para cada factor. La restricción de cada factor a dos niveles, disminuye el número de experimentos pero permite identificar los efectos principales (factores significativos) y las interacciones dobles entre los cuatro factores (Apartado 6.18, Figura A-12).

Luego de realizar todos los experimentos y las determinaciones de las variables respuesta (Biomasa en peso seco g/L, proteína total mg/L y proteína heteróloga mg/L) para la expresión de pET28::HBD2 en la cepa hospedera *E. coli* BL21(DE3), se procedió a ingreso de los datos en el paquete estadístico Design-Expert 5 y al subsiguiente análisis de los resultados obtenidos (Figura A-13).



Std	Run	Block	Factor A:D.O Abs	Factor B:T C	Factor C:t H	Factor D:[PTG] uM	Response Biomasa g/L	Response Prot total mg/L	Response Prot Heterologa mg/L
1	3	Block 1	-1.00	-1.00	-1.00	-1.00	0.5846	41.2035	2.13214
2	1	Block 1	1.00	-1.00	-1.00	-1.00	0.9139	97.0892	6.20397
3	19	Block 1	-1.00	1.00	-1.00	-1.00	0.4958	28.0052	1.66514
4	8	Block 1	1.00	1.00	-1.00	-1.00	0.9176	63.7109	3.45209
5	6	Block 1	-1.00	-1.00	1.00	-1.00	0.8436	63.8845	4.65118
6	2	Block 1	1.00	-1.00	1.00	-1.00	0.9731	86.2048	6.18203
7	14	Block 1	-1.00	1.00	1.00	-1.00	0.518	34.7008	1.91669
8	7	Block 1	1.00	1.00	1.00	-1.00	0.9546	65.0803	3.59307
9	18	Block 1	-1.00	-1.00	-1.00	1.00	0.4403	30.9243	2.19178
10	9	Block 1	1.00	-1.00	-1.00	1.00	0.6475	46.9747	3.27724
11	15	Block 1	-1.00	1.00	-1.00	1.00	0.3256	19.611	1.1856
12	17	Block 1	1.00	1.00	-1.00	1.00	0.6586	37.0809	2.19265
13	10	Block 1	-1.00	-1.00	1.00	1.00	0.4144	27.619	1.42062
14	16	Block 1	1.00	-1.00	1.00	1.00	0.8399	57.8051	3.73283
15	5	Block 1	-1.00	1.00	1.00	1.00	0.4551	27.0296	0.84895
16	20	Block 1	1.00	1.00	1.00	1.00	0.8177	57.4703	2.7641
17	4	Block 1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.4847	31.3402	1.17225
18	11	Block 1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.4682	27.2041	1.04021
19	12	Block 1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.4921	30.0164	1.02674

Figura A- 13. Matriz experimental del Diseño Factorial para aumentar la producción del péptido recombinante HBD2

La gráfica de los residuales muestra que todos los datos experimentales (residuos) se encuentran cerca de la línea lo que indica un comportamiento Normal (Figura A-14).

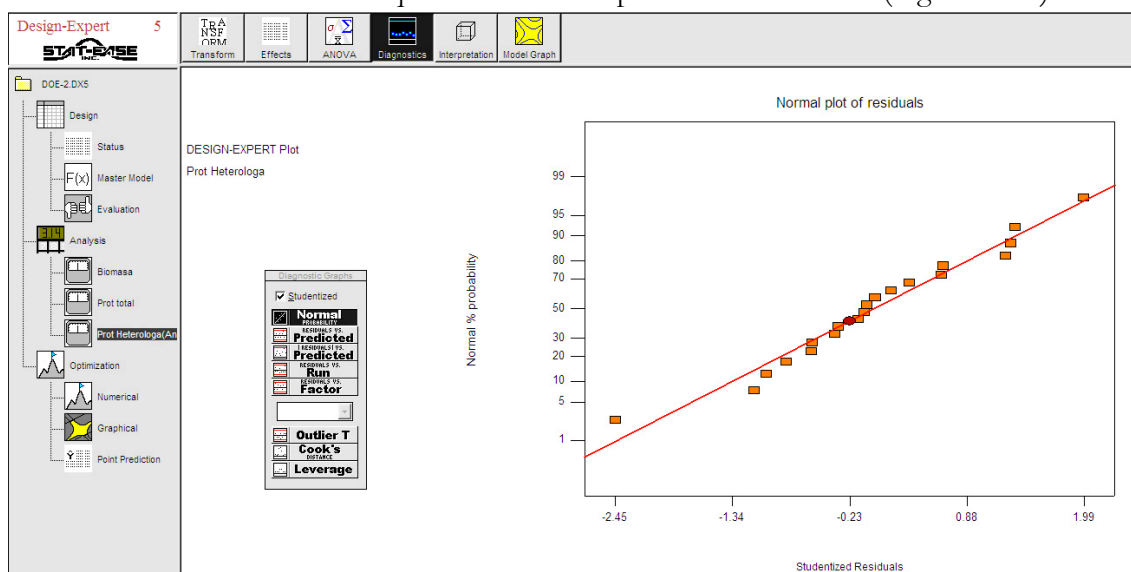


Figura A- 14. Comportamiento de los residuos dentro de una Normal

La variable respuesta que más interesaba era la cantidad de proteína heteróloga que se generaba durante cada uno de los experimentos. Y se encontró que una cantidad elevada de biomasa estaba directamente relacionada con la cantidad de proteína recombinante generada, pero la cantidad de proteína total no necesariamente indicó la mayor presencia de proteína recombinante. Puede pensarse que de alguna manera el péptido, que se expresa en fracción soluble, pueda generar un efecto tóxico sobre la célula hospedera y que a su vez la célula busque la manera de impedir la expresión del péptido y al verse liberada de dicha

carga metabólica, pueda generar otro tipo de proteínas propias de su sistema celular, aumentando así la cantidad de proteína total (Figuras A-13 y A-14).

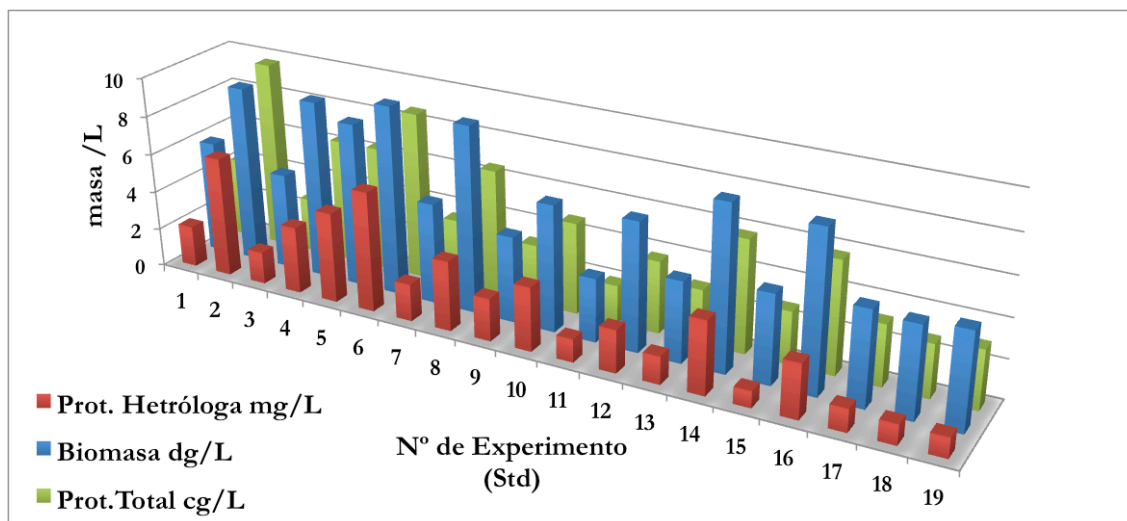


Figura A- 15. Relación entre las cantidades de biomasa, proteína total y proteína heteróloga como resultados del diseño experimental. (mg = miligramos; dg = decigramos; cg = centigramos; L =litros)

Los datos analizados por el programa permitieron identificar los efectos que tienen mayor incidencia en la obtención de la proteína recombinante. En la Figura A-16 se observan dos grupos de datos, los efectos significativos que se encuentran hacia la derecha de la gráfica (cuadros azules) y los datos de la izquierda, que están sobre la línea y que indican un efecto no significativo en el modelo (cuadros naranja). Los efectos significativos fueron A (densidad óptica para la inducción), B (temperatura de la inducción) y D (concentración del inductor IPTG). El efecto C (tiempo de inducción), no fue arrojado por el modelo como significativo, así como no se mostraron interacciones entre efectos que fueran significativas y no fue necesario incluir alguna de las interacciones para soportar la consistencia interna jerárquica en el modelo. El análisis grueso de los factores y sus combinaciones (Figura A-13) sugieren que la mayor producción de péptido heterólogo se logra bajo condiciones que promueven la mayor densidad óptica al momento de la inducción y los menores niveles para los factores temperatura, tiempo y concentración del inductor.

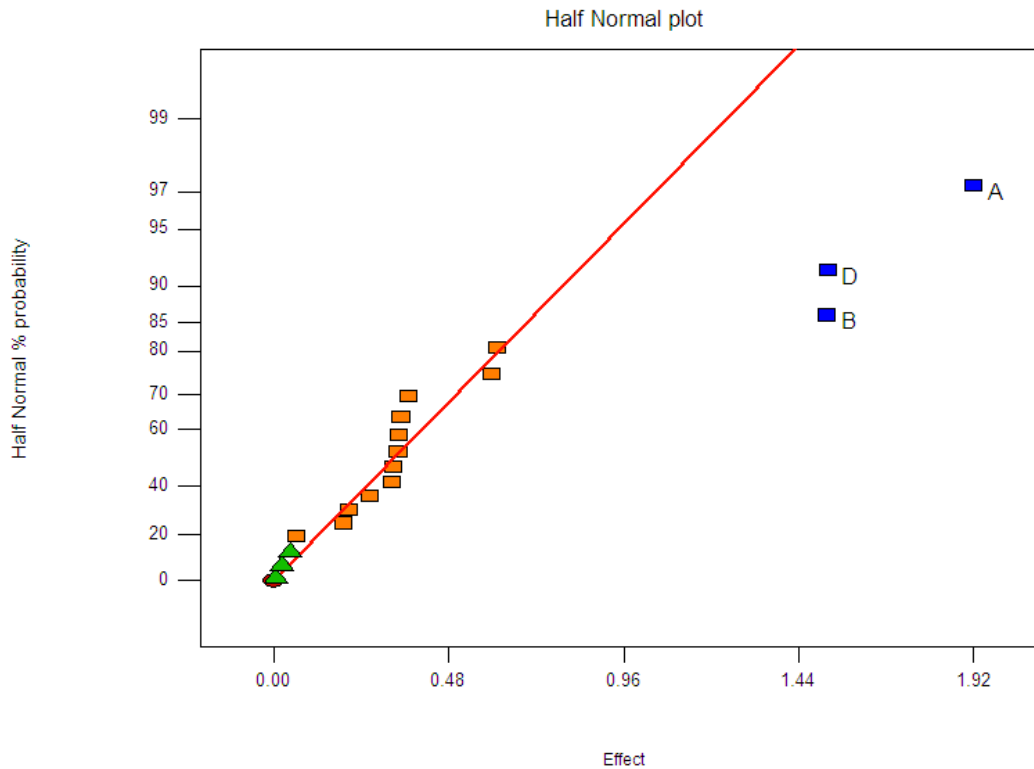


Figura A- 16. Gráfica de probabilidad “Half-Normal”. Se muestran en cuadros azules los efectos seleccionados para el modelo. A. Densidad óptica para la inducción; B. Temperatura de inducción; D. Concentración del inductor IPTG.

La significancia de los coeficientes de cada uno de los factores representados en el modelo, se ilustra en la Figura A-17, en la que el tamaño de cada barra o coeficiente representa la importancia relativa que cada factor ejerce en la expresión del péptido y es determinada con una significancia de $p < 0.05$. Un coeficiente positivo indica que un incremento en dicho factor, relativo a su punto central, puede dar como resultado un aumento en la expresión heteróloga. Un coeficiente negativo indica que la disminución en el factor podría conllevar a una mayor expresión del péptido. Los resultados muestran como los factores A, B y D son los que tienen mayor efecto en el proceso del aumento en la expresión heteróloga, mientras el factor C y la combinación entre los diferentes factores, muestran no tener incidencia en el proceso.

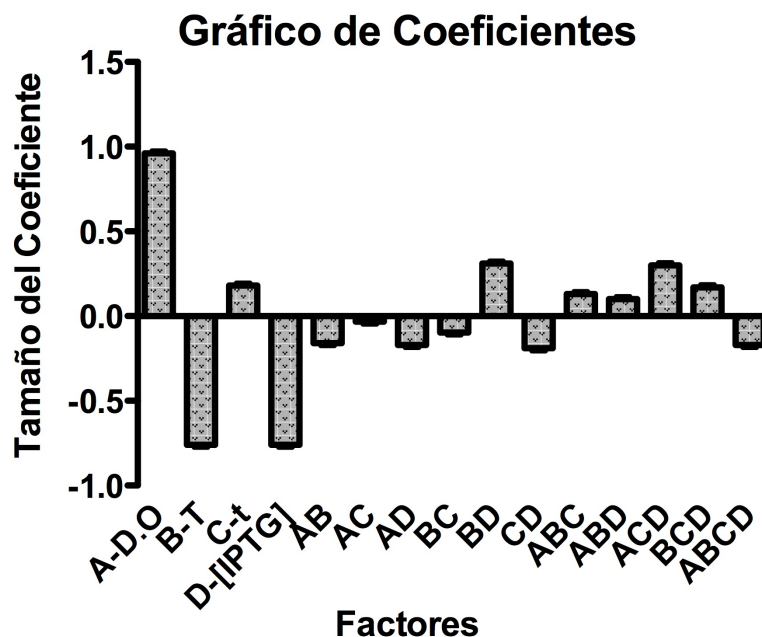


Figura A- 17. Gráfico de coeficientes de los efectos y sus combinaciones para la obtención de proteína recombinante HBD2. El tamaño de cada barra o coeficiente representa la importancia relativa que cada factor ejerce en la expresión del péptido establecida con una significancia de $p < 0.05$. Factores A-Densidad óptica para la inducción; B-Temperatura a la que se hace la inducción; C-tiempo que dura la inducción; D- concentración del inductor IPTG.

Los factores más significativos incluyen, la densidad óptica celular al momento de la inducción (A) que tiene un coeficiente positivo, indicando que la proteína heteróloga se obtiene en el nivel alto del factor (+ 1 = 1.0 U de D.O.); la temperatura a la que procede la inducción (B); y la concentración del inductor IPTG (D) (Figura A-17). Los dos últimos factores muestran coeficientes negativos, indicando que mayor cantidad de péptido heterólogo se obtiene cuando éstos dos factores se encuentran en niveles de inferiores de experimentación. Los puntos al centro de éste diseño experimental no mostraron resultados mejores en el nivel de expresión de proteína, lo que puede indicar degradación de la proteína expresada debido a mayores tiempos de incubación, o inhibición de la maquinaria de expresión heteróloga generada por la toxicidad del péptido expresado. Con base en éstas consideraciones, el mejor nivel de expresión fue de 6.2 mg de proteína heteróloga por litro de cultivo bacteriano que se obtuvo en la corrida 1 en la que las condiciones fueron: densidad óptica al momento de la inducción = 1.0 U; temperatura de inducción = 20 °C; tiempo de inducción = 4 horas; y concentración del inductor IPTG = 0.1 mM. En éste caso de mayor producción de proteína heteróloga coincide con la mayor cantidad tanto de proteína total como de biomasa, pero no puede considerarse como una generalidad, puesto que otros experimentos, con condiciones diferentes también mostraron altos valores en biomasa y en proteína total, más no en la proteína heteróloga que en última instancia es el resultado más importante de todo el diseño experimental para ésta investigación (Figura A-15).

El análisis del varianza (Tabla A-1) indica que el modelo es significativo con una probabilidad $p < 0.0001$, que rechaza la hipótesis nula, lo que indica que la variabilidad del modelo es diferente de la variabilidad debida al error experimental y por consiguiente si hay efecto. La curvatura del modelo calculada por los puntos al centro y con una $p > 0.3478$ no es significativo e indica que el ANOVA es para un modelo que no se ajusta a la curvatura. La suma de cuadrados del residual (7.55) está compuesta por la suma de cuadrados del error puro (1.13) y la suma de cuadrados de lack of fit (6.41) y el ANOVA indica que el lack of fit es mayor contribuyente a la suma de cuadrados del residual y además demuestra que el error puro está asociado a las réplicas del experimento con un valor muy bajo. La carencia de ajuste (lack of fit) indicado por el modelo (>0.6232) demuestran que no es significativo. Un R^2 de 0.81 también refleja la confiabilidad del modelo para predecir el comportamiento experimental, puesto que indica que la variación de las respuestas puede ser explicado por el modelo en un 81%, lo que bastante aceptable tratándose de un ensayos biológicos. El análisis también indica que la variación de la respuesta puede ser predicha por el modelo en un 76.6%. Los resultados también se confirmar por el valor calculado de “precisión adecuada” de 14.77, que satisface el requerimiento mínimo para un modelo adecuado (>4).

Tabla A- 1. Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo de expresión del péptido heterólogo HBD2 en *E. coli*.

Fuente	SS ^a	DF ^b	MS ^c	F (Value)	Prob > F
Modelo	33.33	3	11.11	20.69	< 0.0001
A-D.O	14.8	1	14.8	27.55	0.0001
B-T	9.26	1	9.26	17.24	0.0009
C-[IPTG]	9.28	1	9.28	17.27	0.0008
Curvatura	0.51	1	0.51	0.94	0.348
Residual	7.55	14	0.54		
Lack of Fit	6.41	12	0.53	0.94	0.6266
Error Puro	1.13	2	0.57		
Cor Total	41.39	18			
Std Dev	0.73	R ²	0.8053		
Dep Mean	2.89	Adj R ²	0.7664		
C.V.	25.34	Pred R ²	0.6862		
PRESS	12.99	Adeq Precisión	14.773	Deseado	>4

^a SS: Sum of Square, suma de cuadrados

^b DF: degrees of freedom, grados de libertad

^c MS: mean square, cuadrado de la media

El valor F del modelo, 20.69 implica que el modelo es significativo. La ecuación para el modelo resultante se determina con los coeficientes de regresión estimados (Tabla 23) y que permite aumentar la expresión del péptido recombinante HBD2 es:

$$\text{Proteína recombinante} \left(\frac{mg}{L} \right) = 2.96 + 0.96 * A - 0.76 * B - 0.76 * D$$

ó

$$\text{Proteína Heteróloga} \left(\frac{mg}{L} \right) = 2.96 + 0.96 * D.O. - 0.76 * T - 0.76 * [IPTG]$$

Ecuación A-1. Modelo matemático para expresión del péptido recombinante HBD2

Tabla A- 2. Coeficientes de regresión estimados para los factores significativos en la expresión de HBD2

Factor	Coefficiente	DF	Error Estándar	t para H ₀ Coef=0	p Value
Intercepto	2.96	1	0.17		
A-D.O	0.96	1	0.18	5.88	< 0.0001
B-T	-0.76	1	0.18	-4.65	0.0010
D-[IPTG]	-0.76	1	0.18	-4.65	0.0010
Punto al Centro	-0.45	1	0.37	-5.14	0.3478

Cuando se analizan los datos en las diferentes interacciones, se encuentra que en el análisis de superficie de respuesta, las tendencias en el comportamiento indican que a mayor densidad óptica de inducción, menor concentración del inductor, menor tiempo de incubación y menor temperatura de incubación, puede llegar a obtenerse mayor cantidad de proteína recombinante (Figura A-18).

Design-Expert® Software
 Prot Heterologa
 ● Design points above predicted value
 ○ Design points below predicted value
 6.20397
 0.84895
 X1 = A: D.O
 X2 = B: T
 Actual Factors
 C: t = -1.00
 D: [IPTG] = -1.00

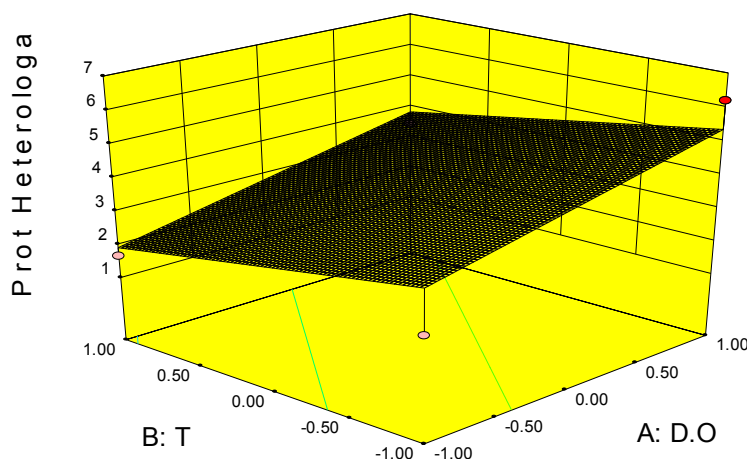


Figura A- 18. Gráfico de superficie de respuesta. Los factores que tienen incidencia sobre la producción del péptido recombinante HBD2 son Densidad óptica de inducción (D.O.), temperatura de inducción (T). Los factores tiempo de inducción (t) y concentración del inductor (IPTG), se circunscribieron a sus menores valores. La superficie de respuesta se genera por la ecuación 1.

El modelo resultante tiene la capacidad de predecir el nivel óptimo de los factores evaluados o la región en la que puede encontrarse la mayor producción de proteína recombinante. De manera que se procedió a realizar una validación del modelo, que involucra la verificación experimental de las predicciones del modelo bajo condiciones que no se hayan evaluado específicamente en el diseño experimental. Para éste procedimiento se utilizó un cultivo celular de 500 mL, que se dejó en crecimiento hasta una densidad óptica para la inducción de 1.3 U, luego se indujo con 0.1 mM de IPTG a 20 °C durante 6

horas. El experimento se realizó por triplicado. Al terminar los experimentos, se realizaron las determinaciones de las variables respuestas del diseño experimental bajo iguales consideraciones, obteniéndose:

- Biomasa en peso seco de 1.4 ± 0.2 g/L (g/L biomasa = $0.37 \cdot \text{Abs}(600\text{nm})$) para la cepa *E. coli* BL21 (DE3))
- Proteína total 602 ± 90 mg/L (determinada por BCA y BSA como proteína estándar para la determinación de la curva patrón)
- Proteína recombinante 57.7 ± 8 (mg/L) (el análisis de la expresión de proteína de recombinante en los geles de Tricina-SDS-PAGE (tinción Coomassie), y las bandas se cuantificaron y analizaron por medio de imágenes de los geles usando el equipo ChemiDoc (BioRad: software ImageLab)).

La verificación demuestra entonces que posible obtener una mayor cantidad de HBD2 bajo las condiciones establecidas por el modelo del diseño experimental. Desafortunadamente la cantidad de proteína recombinante calculada en la verificación es hecha por análisis de imágenes y cuando posteriormente se realizaron todos los procesos de purificación del péptido solo se llega recuperar el 7% del péptido de interés, es decir 4 ± 0.1 mg/L (Tabla 17).

La cepa *E. coli* BL21(DE3), es una de las más usadas en los procesos de expresión recombinante de proteínas que se encuentran bajo control del promotor T7. Generalmente la temperatura de 37 °C es usada en la expresión de proteínas recombinantes, pero se ha demostrado que también se logran expresiones a temperaturas menores, y que la solubilidad de los péptidos recombinantes puede llegar a mejorar significativamente a temperaturas entre 17 y 25 °C ².

Referencias

- 1 Dumon-Seignovert, L., Cariot, G. & Vuillard, L. The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(de3), and C43(DE3). *Protein Expr. Purif.* **37**, 204 - 206, doi:10.1016/j.pep.2004.04.025 (2004).
- 2 Benoit, I., Coutard, B., Oubelaid, R., Asther, M. & Bignon, C. Expression in *Escherichia coli*, refolding and crystallization of *Aspergillus niger* feruloyl esterase a using a serial factorial approach. *Protein Expr. Purif.* **55**, 166 - 174, doi:10.1016/j.pep.2007.04.001 (2007).
- 3 Coutard, B., Gagnaire, M., Guilhon, A.-A., Berro, M., Canaan, S. & Bignon, C. Green fluorescent protein and factorial approach: an effective partnership for screening the soluble expression of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **61**, 184 - 190, doi:10.1016/j.pep.2008.05.014 (2008).

Anexo 4: Productos generados durante el desarrollo de la investigación

A.4.1 Artículo: Expression systems of human β -defensins: vectors, purification and biological activities

A.4.2 Artículo: Bacterial expression and antibiotic activities of recombinant variants of human β -defensins on pathogenic bacteria and *M. tuberculosis*

Expression systems of human β -defensins: vectors, purification and biological activities

L. L. Corrales-Garcia · L. D. Possani ·
G. Corzo

Received: 11 December 2009 / Accepted: 19 January 2010 / Published online: 20 March 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract Human beta-defensins are 2–5 kDa, cationic, microbicidal peptides, which represent the first-line host defense against several Gram-negative and Gram-positive bacteria, fungi and viruses. They contain a conserved disulfide-bridge pattern of three pairs of intramolecular cystine bonds. The well-known public health problem related with the growing number of multiresistant bacteria has driven research to look for novel antibiotics, such beta-defensins and a feasible way to produce them. Heterologous expression of beta-defensins could be one way to generate large quantities of beta-defensins for clinical research; however, heterologous expression of beta-defensins has some biochemical problems, such toxicity toward the host cell, peptide degradation by proteolytic cell enzymes, size, folding constrains and low recombinant peptide yields. In this communication, several heterologous systems for producing human beta-defensins are reviewed.

Keywords Antibiotic · Bacteria · Defensin · Heterologous expression · Antimicrobial · Peptide

Introduction

Antimicrobial peptides represent the first-line host defense against pathogens. They act as part of non-specific response of multi-cellular organisms, among which are plants, insects, birds, amphibians, lower eukaryotes and mammals (Bensch et al. 1995; Hancock and Chapple 1999; Hancock and Diamond 2000; Hancock 2001; Schneider et al. 2005; Aerts et al. 2007), but they cannot recognize specific antigens. One of the first antimicrobial peptides found by Fleming was lysozyme (Fleming 1922) and since then much work has been performed to find new and strong antimicrobial peptides. A considerable amount of antimicrobial cationic peptides has been reported during the last 25 years. Some antimicrobial peptides have common characteristics, such as short length (15–47 amino acid residues) and high basic net charge, having at least four lysines and/or arginine residues, as is the case of human β -defensins. Among the antimicrobial peptides, the defensins constitute a significant peptide family. They have been found broadly in plants, insects, reptiles, birds and mammals (Lehmann et al. 2002; Lehrer and Ganz 2002; Zasloff 2002). They have been identified directly in different tissues and organs or by cloning and genome analysis. Mammalian defensins are divided into three groups, α -defensins, β -defensins and θ -defensins, differing in their disulfide-bridge pattern and number of cationic charges. To date, six human α -defensins (HNP-1-4, HD-5 and HD-6) (Lehrer 2004) and 31 human β -defensins (HBD1-31) have been reported and all of them are considered part of the immune system (Schutte et al. 2002). Apart from being short-chain peptides with a net positive charge, their tridimensional structures are tightly folded by three disulfide bridges. Defensins exhibit a broad antimicrobial activity spectrum and usually show low

L. L. Corrales-Garcia · L. D. Possani · G. Corzo
Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos,
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de
México, UNAM, Apartado Postal 510-3,
61500 Cuernavaca, Morelos, México

G. Corzo (✉)
Institute of Biotechnology, UNAM, Av. Universidad 2001,
Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico
e-mail: corzo@ibt.unam.mx

susceptibility to generate bacterial resistance (Ganz 2002, 2003; Song et al. 2009).

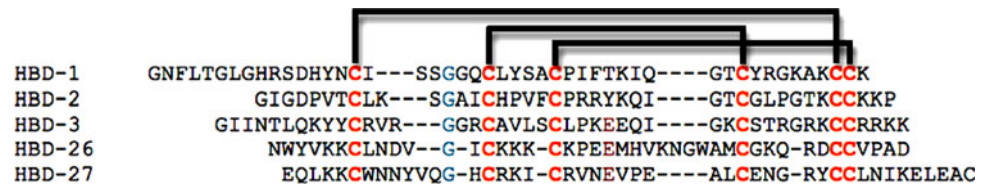
The β -defensins are cationic peptides showing three strands of antiparallel β -sheets that provide a compact small structure (Schneider et al. 2005) and also possess an α -helix at the N-terminal region (Hoover et al. 2000, 2001; Schibli et al. 2002; Hoover et al. 2003; Dhople et al. 2006) (PDB codes for HBD1, HBD2 and HBD3 are 1IJU, 1FD3, 1KJ6, respectively). Usually contain 38–47 amino acid residues with a molecular weight from 4 to 5 kDa. They are highly cationic at neutral pH due to a high number of lysine and arginine residues (Schöder and Harder 1999). They all contain a triple antiparallel β -sheet stabilized by three disulfide bridges (Schneider et al. 2005) made between six cysteine residues. Figure 1 shows representative structures of human β -defensins. A large list of human β -defensin genes was uncovered using computational techniques and the human genome available (Schutte et al. 2002). High-resolution structure of human β -defensins 1, 2 and 3 have been elucidated using X-ray crystallography and NMR spectroscopy (Hoover et al. 2000; Schibli et al. 2002); however, there is still much to be learned about the structure–function relationship of human β -defensins. Similar to other antimicrobial peptides, the principal function of β -defensins is to control bacteria and fungi growth and development by affecting their surrounding membrane surface, such as the case of HBD2 and HBD3 (Harder et al. 2001) or by acting into phagolysosomes (HBD1) (Schöder and Harder 1999). They are molecules involved in the innate immunity defense system in mammals and their main purpose is to protect the organisms and their systems against microorganism invasion. Up to date, several reports have demonstrated the chemoattractant activity of β -defensins (Dhople et al. 2006; Wong et al. 2007); however, other reports such as Hoover et al. (2003) have confronted this idea only if the β -defensin is not folded correctly. As more β -defensins will be experimentally assayed and their positive or negative chemoattractant activities will be established. Furthermore, pathogenic bacteria seem to have a low possibility to become resistant to defensins (Song et al. 2009). Human defensins are endogenous antibiotics with broad bactericidal activity toward Gram-positive and Gram-negative bacteria, not only affect a few pathogenic fungi (Schneider et al. 2005; Schwaab et al. 2009), capsulate viruses and protozoa (Mathews et al. 1999; Zasloff 2002; Schneider et al. 2005; Schwaab et al. 2009). Since 1995, at least four β -defensins have been characterized in humans (Lehmann et al. 2002; Schwaab et al. 2009). Human defensins exert antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, such as *Mycobacterium tuberculosis*, *Treponema pallidum*, *Chlamydia trachomatis*, *Listeria monocytogenes* (Porter et al. 1997), *Staphylococcus aureus* (Wu et al. 2003),

Escherichia coli and *Pseudomonas aeruginosa* (Harder et al. 1997; Zasloff 2002; Schneider et al. 2005; Xu et al. 2006a; Schwaab et al. 2009), yeast such as *Candida albicans* (Harder et al. 1997; Zasloff 2002) and other fungi. They also can affect enveloped viruses (Harder et al. 1997; Porter et al. 1997; Zasloff 2002; Schneider et al. 2005; Xu et al. 2006a; Schwaab et al. 2009). It is possible that β -defensins have appeared as alternative antimicrobial agents and could be used in therapeutics, food preservative and novel antibiotic drugs.

The heterologous expression system of β -defensins has several biochemical problems, such as toxicity toward the host cell, peptide degradation by proteolytic cell enzymes and their small size (Valore and Ganz 1997). Moreover, β -defensins are not easily detectable. Therefore, understanding the mechanisms and activities of the β -defensins have been hampered by the lack of appropriate expression systems, which could produce significant amounts and effective biological quality of these types of antimicrobial peptides. The possible production of human β -defensins by means of genetic engineering would allow obtaining a sufficient amount of peptide for complementary studies and assays. It would be important for control of resistant pathogen bacterial infections, but would allow conducting additional studies on their molecular interactions and antimicrobial mechanisms, as well on their eventual use in public health care. In addition, β -defensins are not expected to induce use-dependent resistance microorganisms; thus, becoming a perfect natural antibiotic. Therefore, the purpose of this communication is to revise the state of the art on the study of human β -defensins concerning their expression systems and biological activities of the recombinant products.

Heterologous expression of β -defensins

The prominent public health problem related with the growing number of multi-resistant bacteria motivated further research on the subject, leading to the discovery of natural existing peptide that could be used in solving the problem. A few years ago, the ways of obtaining these small cationic peptides were (1) isolation from the host organism, which requires large amounts of material from the source with the problem of having very low yields of the interest peptide; and (2) chemical synthesis of peptides, which generate high costs and low yields because of the in vitro folding steps. Therefore, genetic engineering became a great strategy to produce large amounts of interesting cationic peptides with low cost, to produce possible variants using site-directed mutagenesis, and to elucidate the antimicrobial mechanisms and to improve the final yields.

Fig. 1 Linear structures and alignment of human β -defensins

The production of heterologous proteins have been studied for years, established and developed in different kind of expression systems, such as prokaryotes, yeast, plants and viruses (Terpe 2006). In recent years, genetic engineering has become one of the most attractive methods to obtain recombinant proteins from microorganisms, due to their fast growth, high product density with a low cost substrate, well characterized genetic and mutant host strains and cloning vectors availability (Terpe 2006). Table 1 summarizes most of the studies on the heterologous expression of β -defensins. However, the rational choice of appropriate promoter system and host for production of a specific interest protein is difficult and requires much attention and thoughts (Terpe 2006). Indeed, selection of *E. coli* strains with low proteolytic activity and the use of carefully designed plasmids to prevent the toxic activity of β -defensins is decisive for obtaining cationic antimicrobial peptides (Fang et al. 2002). Among the important steps taken towards a rational design for successful expression of recombinant β -defensins are the choice of different fusion protein hybrids which protect from protein degradation inside the cell, and prevents the antimicrobial activity of the peptide against the host cell, but allows in identifying the hybrid produced in the expressing system (Piers et al. 1993). Finally, this fusion protein can be released by specific proteolytic action, leaving no extra amino acids on the N- and C-terminal regions (Piers et al. 1993; Terpe 2006; Xu et al. 2006a).

Basic to the successful recombinant production of β -defensins is to choose a system that permits a correct folding of the peptide, with accurate disulfide-bridge formation, assuring in this way the effectiveness of the antimicrobial action (Estrada et al. 2007). Hence, it is necessary to evaluate and consider the potential of some vectors and expression systems because many bacterial systems are not able to conduct post-transcriptional modifications on proteins, thus, some of the bacterial expression systems could not be appropriate for the production of heterologous proteins. This would require the implementation of additional steps for solving the problem. Obtaining recombinant proteins in the format of inclusion bodies inside the bacterial cell, selection of alternative hosts such as yeast, insects, plants (Terpe 2006) would offer a feasible solution for β -defensin production. In the following sections, several expression systems of β -defensins will be revised.

Bacteria

To study β -defensin mechanisms and antibacterial activity, it is imperative to produce high amounts of active isoforms. One of the best expression systems studied used as host strain to produce human β -defensins is *E. coli*. It is used both in the subcloning as in the expression of proteins. Nevertheless, it is important to consider molecular biology troubles to overcome when *E. coli* is used as a host strain, such as preferential codon usage and survival of strain when an antimicrobial molecule is produced. Codon optimization improves defensins production (Peng et al. 2004b). In most cases, the sequence of the mature defensin gene is obtained from information deposited in public data base, such as NCBI; chemically synthesized and inserted in a cloning plasmid, such as pBluescript II SK (+) (Cipáková et al. 2004), pGEM-T (Promega®) (Fang et al. 2002; Chen et al. 2005; Huang et al. 2006; Xu et al. 2006b; Song et al. 2009; Vargues et al. 2009). The constructed gene is then expressed using plasmids like: pLMM (Cipáková et al. 2004), pET-32 (+) (Stratagene®) (Peng et al. 2004a; Huang et al. 2006; Xu et al. 2006a, b; Huang et al. 2008; Song et al. 2009) and pET-28 (+) (Stratagene®) (Fang et al. 2002; Vargues et al. 2009). For most cases, the product is expressed in the format of hybrids, that is, the defensin gene is fused to a carrier protein.

Fusion proteins

All these designs rely on different fusion proteins bound to the peptide of interest, working as a carrier of the defensin peptide. The function of the carrier protein is to protect the small cationic peptides against proteolytic degradation (Piers et al. 1993). In addition, the fusion system provides several advantages (1) they protect the hybrid when proteases are exported to the external environment, (2) the carrier protein might show affinity for a specific ligand, which enables easy purification not only might prevent antimicrobial peptide toxicity against the host cell and (3) the carrier protein can finally be released by specific proteolytic action, leaving no extra amino acids on the C- or N-terminal regions. Among the fusion proteins are glutathione *S*-transferase (GST) (Piers et al. 1993; Wang et al. 2004; Li-Gang et al. 2007); the presence of histidine tails, which permits an easy purification of the hybrid protein;

Table 1 Different molecular systems of beta-defensins expression

	HBD-1	HBD-1	HBD-2	HBD-2	HBD-2
Clone plasmid	pBluescript II SK (+)	pBluescript II SK (+) and pPIC9 K	pGEM-T	pGEM-T	pGEM-shBD2
Strains (Cloning)	<i>E. coli</i> TG1	<i>E. coli</i> TG1	<i>E. coli</i> TG1	<i>E. coli</i> DH5a	<i>E. coli</i> DH5a
Expression plasmid	pLMM	pVT103L	pET-32 (+)	pET-28a (+)	pIVEX2.4c-TrxA-shBD2
Expression strain	<i>E. coli</i> AD202	<i>S. cerevisiae</i> strain AH22	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Free-cell system (CECF)
Fusion protein	LMM	None	TrxA	N-term + 35 aa + 6-His	TrxA (from pET32)
Promoter	Lac	ADH1	T7/Lac	T7/Lac	T7
Culture conditions	37°C up to 0.7–0.8 OD	28°C, 250 rpm; 120 h up to 0.5 OD	37°C, 250 rpm; up to 0.7 OD	30°C, 200 rpm up to 0.4 OD	30°C, 990 rpm, 24 h
Inductor	100 µM IPTG	None	0.8 mM IPTG	0.8 mM IPTG	None
Expression time	8 h	No	8 h	4 h	None
Induction temperature	37°C	No	37 and 28°C	37°C	None
Yield	1 mg HBD1/6 g cell (dry weight)	55 µg/L	346 mg/L 28°C; 235 mg/L 37°C	DNS	2 mg/mL CECF
6×-His	No	No	Yes	Yes	Yes
Protein obtained	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble
Folding data	None	None	None	None	None
Biological activity	<i>E. coli</i> clinical isolates	<i>E. coli</i> ML35-p (dose 150 ng)	<i>E. coli</i> K12D31 >5 µg/mL	DNS	<i>E. coli</i> D31
Culture medium	LB	YPD (for cell growth) and TSB (antimicrob)	LB, MBL	2×YT	Kit for cell-free systems
Reference	Cipáková et al. 2004	Cipáková and Hostinová 2005	Xu et al. (2006a, b)	Fang et al. 2002	Chen et al. (2005)
	HBD-2	HBD-2	HBD-2	HBD-3	HBD-3 -4
Clone plasmid	DNS	pGEM-T easy	pGEM-T	pGEM-T	pET32-shBD3 pET32-shBD4
Strains (cloning)	<i>E. coli</i> TG1	<i>E. coli</i> Top 10	<i>E. coli</i> TG1	<i>E. coli</i> DH5α	<i>E. coli</i> DH5α
Expression plasmid	pET-32a (+)	pET-28a (+) {pET-31b (+)}	pET-28a (+) y pGEX-4T-2	pET-32a (+)	pIVEX2.4c
Expression strain	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Free-cell system
Fusion protein	TrxA	Keto-steroid isomerase (KSI)	GST and multiple HBD2 genes	No	trxA from pET32; GFP from pBluescript-GFP
Promoter	T7/Lac	T7/Lac	T7/Lac	T7/Lac	T7
Culture conditions	37°C, 250 rpm up to 0.4 OD	37°C, 200 rpm up to 0.5 OD	30°C, 200 rpm; up to 0.4 OD	37°C, 200 rpm; up to 0.6 OD	30°C, 300 rpm, 3 h
Inductor	0.8 mM IPTG	1 mM IPTG	0.8 mM IPTG	0.6 mM IPTG	DNS
Expression time	8 h	6 h	4 h	4 h	DNS
Induction temperature	25 and 28°C	37°C	37°C	37°C	DNS
Yield	1.3 g/L batch de 10L	HBD-2 oxidized 1–2 mg/L	DNS	1 g/L protein and 23% HBD3	trx-HBD-3: 390 385 GFP-HBD-3: 310 320 µg/mL
6×-His	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes (in pIVEX2.4c)
Protein obtained	Soluble	Inclusion bodies, guanidine 6 M	Inclusion bodies	Inclusion bodies	Soluble
Folding data	None	Yes	None	None	None
Biological activity	None	<i>E. coli</i> K12 MG1655; <i>P. aeruginosa</i> (PAO1), <i>S. aureus</i> (ATCC 25923), <i>C. albicans</i> (J2922) >5 µg/mL	No	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 (0.195 g/mL); <i>E. coli</i> ATCC 25922 >25 g/mL	No

Table 1 continued

	HBD-2	HBD-2	HBD-2	HBD-3	HBD-3 -4
Culture medium	LB y MBL (Jar fermenter)	2×YT	LB	LB (for cell growth) and brain–heart infusion for antimicrobial activity	Kit for cell-free systems
Reference	Peng et al. (2004a, b)	Vargues et al. (2009)	Wang et al. (2004)	Song et al. (2009)	Chen et al. (2007)
	HBD-3	HBD-3	HBD-4	HBD-5-6	HBD-26-27
Clone plasmid	pGEX-KG	pGEM-T	pGEM-T	pDrive	pDrive
Strains (cloning)	<i>E. coli</i> Top 10	<i>E. coli</i> TG1	<i>E. coli</i> TG1	<i>E. coli</i> NovaBlue	<i>E. coli</i> NovaBlue
Expression plasmid	pGEX-KG- HBD-3	pET-32a (+)	pET-32a (+)	pET-32a (+)	pET-32a (+)
Expression strain	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)
Fusion protein	GST	TrxA	TrxA	TrxA	TrxA
Promoter	Lac	T7/Lac	T7/Lac	T7/Lac	T7/Lac
Culture conditions	Up to 0.3–0.5 OD	32°C, 250 rpm up to 0.4 OD	37°C; up to 9 OD	32°C; 220 rpm up to 10 OD	32°C; up to 10 D.O
Inductor	0.5 mM IPTG	0.5 mM IPTG	0.4 mM IPTG	0.4 mM IPTG	0,4 mM IPTG
Expression time	DNS	6 h	6 h	4 h	4 h
Induction temperature	DNS	DNS	34°C	DNS	4 h; 32°C
Yield	DNS	trx-HBD-3: 0.99; trx-HBD-4: 0.09 g/L	0.689 g/L	0.38 g HBD5/L; 0.36 g HBD6/L	0,31 g/L HBD26; 0,31 g/L HBD27
6×-His	No	Yes	Yes (between Trx and hBD4)	Yes (between Trx and hBD)	Yes
Protein obtained	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble
Folding data	None	None	None	None	None
Biological activity	<i>S. aureus</i> (ATCC25923) 12.5 µg/mL	<i>E. coli</i> K12D31	<i>E. coli</i> K12 D31, <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E. coli</i> K12	<i>E. coli</i> K12, <i>S. aureus</i> and <i>S. cerevisiae</i>
Culture medium	LB	LB y MBL (jar fermenter)	LB, MBL (for expression), Muller–Hinton (antimicrobial)	LB, MBL (for expression), Muller–Hinton (antimicrobial)	LB, MBL (for expression), Muller–Hinton (antimicrobial)
Reference	Li-gang et al. (2007)	Huang et al. (2006)	Xu et al. (2006a, b)	Huang et al. (2008)	Huang et al. (2009)

DNS data not shown

thioredoxin fusion protein (Trx) (Peng et al. 2004a; Chen et al. 2005; Huang et al. 2006; Xu et al. 2006b; Huang et al. 2008, 2009) which helps the disulfide-bridge formation and facilitates accurate folding process. In addition, Trx interact with human β -defensins and shades their antimicrobial action (Huang et al. 2006) avoiding the interaction with bacterial membrane, thus protecting the host cells from cationic peptide activity (Piers et al. 1993). Other constructions have used: green fluorescent protein (Chen et al. 2007); light meromyosin (Cipáková et al. 2004) and ketosteroid isomerase (Vargues et al. 2009). In short, the use of defensins joined with carrier proteins has become a possible method to reduce toxicity, increase yield and improve biological activity by facilitating the correct disulfide pairing.

Induction, purification, folding and biological activity

The induction of the protein of interest is certainly related to the plasmid characteristics chosen, but alternatively it is convenient to consider the use of a strong promoter to easily regulate the expression of the desired product. The molecular design details of expression vector can be crucial to the level of protein production (Bass and Yansura 2000). Upstream of the HBDs mature sequences, it is usually suggested to use a histidine tag and an enterokinase recognition site, which will be important for protein purification using affinity chromatography and for releasing the desired peptide from the hybrid protein. Proper peptide folding is then required for effective antimicrobial activity against pathogenic bacteria (Lehmann et al. 2002).

Limitations and yield

One of the main limitations in the expression of β -defensins is the amount of active product. Although some reports have claimed a large production of β -defensins (Peng et al. 2004a, b; Song et al. 2009), they have failed to prove the correct folding and activity of such antimicrobial peptides (see Table 1).

Yeast and fungi

The use of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as host for the production of β -defensins offers several advantages. It does not require induction for expression (Cipáková and Hostinová 2005) and it does not need the use of cleavage factors, nor uses additional systems for proper folding. Therefore, the effective biological activity of the antimicrobial peptide could be used at the end of the expression.

Strains and vectors

The most use strain has been *S. cerevisiae* AH22 (*MATa leu2-3 leu2-112 his4-519 can1^R*) ATCC 38626 (Cipáková and Hostinová 2005). The yeast plasmid pVT103L (6.3 kbp) confers the capability of growing in media lacking leucine and the plasmid marker *Leu⁺* exhibits stability during mitotic cell division. The deficient *leu2-d* gene of the pVT103L vector confers a high copy number to this plasmid in yeast.

Induction, purification, folding and biological activity

It has been demonstrated that the expression in yeast of the defensin HBD1 by genetic engineering was successful. Expressed and purified recombinant protein demonstrated bacterial killing against *E. coli* ML35p as low as 150 ng dose, and the effect was shown to be peptide concentration-dependent (Cipáková and Hostinová 2005). This β -defensin was purified by CM Sepharose and it was not subject to any additional folding process. The positive result in antimicrobial activity was correlated with the correct peptide folding (Cipáková and Hostinová 2005).

Limitations and yield

During the production of HBD1, Cipáková and Hostinová (2005) found that the amount of secreted β -defensin obtained by liquid fermentation, 250 rpm, 28°C in YPD media for 120 h, was dropping along the culture time, from 55 $\mu\text{g/l}$ at 48 h to 9 $\mu\text{g/l}$ at 120 h. The diminished product yield was correlated with the low stability of HBD1 at 28°C and proteolytic activity inside the fermentation media more than with the inhibition of *S. cerevisiae* growth due to β -defensin expression. Indeed, they showed that the transformants secretes into the medium and stands the presence of HBD1 (Cipáková and Hostinová 2005).

Plant cells

The first defensin found in plants was γ -threonine, which was isolated from wheat and barley grains in the 1990s. Later on, it was demonstrated that the same defensin was present in all plant kingdom. Plant defensins are active molecules acting against phytopathogenic fungi (such as *Botrytis cinerea*) (Aerts et al. 2007). Seeking to demonstrate if human defensins could confer protection against fungus attack, the plant species *Arabidopsis thaliana* was used as a recombinant system to obtain human β -defensin 2. The bacteria *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 was transformed with the vector pCMPG7057 harboring HBD2-coding sequence. HBD2 was coupled to a leader peptide

DmAMP1, which is part of plant defensins, to go throughout the plant secretory system to obtain finally a correct disulfide bond formation. The presence of the transgene HBD2 in transformant plants was confirmed using PCR analysis with HBD2-specific primers to amplify the region of the inserted gene. After *A. thaliana* growth, the recombinant protein was obtained from the transgenic leaves. It was proved that the over expression of HBD2 conferred resistance against fungal infection (Li et al. 2003; Aerts et al. 2007). Therefore, it is possible to produce HBD2 and other defensins using plants as expression systems for obtaining higher quantities of the antimicrobial peptides.

Phage/baculoviruses

Variants of human β -defensin 1 containing different amino acid chain lengths (36, 39 and 42 residues) were produced using an insect cell/baculovirus protein expression system through ligation of inserts into the BacPAK9 transfer vector (Clontech). The vector was transformed and amplified in *E. coli* XL-1 blue, then co-transfected with the transfer vector as the defective baculovirus into *Spodoptera frugiperda* Sf21 insect cell line. Finally, viable recombinant baculoviral clones were harvested from culture medium after co-transfection. Individual viral clones were selected using a plaque assay (Porter et al. 1997; Valore et al. 1998). Additional work reported the use of the nuclear polyhedrosis virus *Autographa californica*, which generates baculoviral polyhedrin (Polh) that protects virus particles from biochemical or physical degradation. Polyhedrin also keeps virus infection potential, as a fusion partner during recombinant protein obtained in *E. coli* expression systems and leads to the formation of inclusion bodies (Wei et al. 2005). These phage systems could be used to express β -human defensins against pathogenic Gram-negative as Gram-positive bacteria (Valore et al. 1998; Wei et al. 2005), but there are still issues to be solved, such as establishing whether the recombinant peptides produce in insect cells possess the adequate folding system, despite its large possibilities of the disulfide-bridge formation. Nevertheless, it is important to consider that HBD1 and HBD2 can fold to form native disulfide-bridge pairing structures in vitro, whereas HBD3 generates a complex mixture of products under similar conditions. It is possible that the higher number (one-third of the peptide) of positive charges in HBD3 may have contributed to impede the correct native-like folding (Wu et al. 2003).

Free-cell systems

Wall and cell membrane disruption, pore formation, lost of internal homeostatic equilibrium and cell death are related

to possible human defensins activities. To avoid these damages in the protein expressing cell, a cell-free system could be used as an alternative for producing harmful molecules (Chen et al. 2007). This in vitro system might work in the absence of cells, since all the required transcription and protein translation machinery is still present for the production of proteins (Chen et al. 2006, 2007).

Concluding remarks

Finding the correct folding conditions is an important issue for heterologous expression of proteins, particularly for specific disulfide-bridge formation that allows the recombinant molecules to be biologically active. Table 1 shows several expression systems for the production of β -defensins, including the production of possibly folded three disulfide-bridged human β -defensins by heterologous means. Unfortunately, there are poor demonstrations of correct folding of the peptides. The validation of the results is mainly based on the biological activity (Fang et al. 2002; Cipáková et al. 2004; Peng et al. 2004a; Chen et al. 2005; Cipáková and Hostinová 2005; Huang et al. 2006; Xu et al. 2006a, b; Chen et al. 2007; Li-Gang et al. 2007; Huang et al. 2008; Song et al. 2009). Additional reports have claimed to have expressed successfully three disulfide-bridged β -defensins, but they have not demonstrated the correct folding and the biological activity of the product.

Acknowledgments This work was supported by grants from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) IN220809 to GC. Ligia Luz Corrales is recipient of a Ph.D. scholarship (331398/229367) from CONACyT.

References

- Aerts AM, Thevissen K, Bresseleers SM, Sels J, Wouters P, Cammue BPA, François IEJA (2007) *Arabidopsis thaliana* plants expressing human-defensin-2 are more resistant to fungal attack: functional homology between plant and human defensins. *Plant Cell Rep* 26:1391–1398. doi:10.1007/s00299-007-0329-4
- Bass SH, Yansura DG (2000) Application of the *E. coli trp* promoter. *J Mol Biol Res Protoc Rev Appl* 16:253–260. doi:10.1385/0-89603-480-1:55
- Bensch KW, Raida M, Mägert H-J, Schulz-Knappe P, Forssmann W-G (1995) hBD-I: a novel-defensin from human plasma. *FEBS* 368:331–335. doi:10.1016/0014-5793(95)00687-5
- Chen H, Xu Z, Xu N, Cen P (2005) Efficient production of a soluble fusion protein containing human-defensin-2 in *E. coli* cell-free system. *J Biotechnol* 115:307–315. doi:10.1016/j.jbiotec.2004.08.012
- Chen H, Xu Z, Xu N, Cen P (2006) High-level expression of human-defensin-2 gene with rare codons in *E. coli* cell-free system. *Prot Pept Lett* 13:155–161. doi:10.2174/092986606775101724
- Chen H, Fan L, Xu Z, Yin X, Cen P (2007) Efficient production of soluble human-defensin-3–4 fusion proteins in *Escherichia coli*

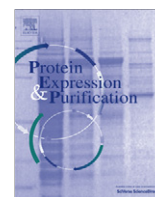
- cell-free system. *Process Biochem* 42:423–428. doi:[10.1016/j.procbio.2006.10.002](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.10.002)
- Cipáková I, Hostinová E (2005) Production of the human-defensin using *Saccharomyces cerevisiae* as a host. *Prot Pept Lett* 12:551–554. doi:[10.2174/0929866054395761](https://doi.org/10.2174/0929866054395761)
- Cipáková I, Hostinová E, Gasperík J, Velebný V (2004) High-level expression and purification of a recombinant hBD-1 fused to LMM protein in *Escherichia coli*. *Prot Expr Purif* 37:207–212. doi:[10.1016/j.pep.2004.04.024](https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.04.024)
- Dhople V, Krukemeyer A, Ramamoorthy A (2006) The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions. *Biochim Biophys Acta* 1758:1499–1512. doi:[10.1016/j.bbame.2006.07.007](https://doi.org/10.1016/j.bbame.2006.07.007)
- Estrada G, Garcia BI, Schiavon E, Ortiz E, Cestele S, Wanke E, Possani LD, Corzo G (2007) Four disulfide-bridged scorpion beta neurotoxin CsxII: heterologous expression and proper folding in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1770:1161–1168. doi:[10.1016/j.bbagen.2007.04.006](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.04.006)
- Fang X, Peng L, Xu Z, Wu J, Cen P (2002) Cloning and expression of human-defensin-2 gene in *Escherichia coli*. *Prot Pept Lett* 9:31–37. doi:[10.2174/0929866023409011](https://doi.org/10.2174/0929866023409011)
- Fleming A (1922) On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc R Soc Lond* 93:306–317. doi:[10.1098/rspb.1922.0023](https://doi.org/10.1098/rspb.1922.0023)
- Ganz T (2002) Versatile defensins. *Science* 298:977–978. doi:[10.1126/science.1078708](https://doi.org/10.1126/science.1078708)
- Ganz T (2003) The role of antimicrobial peptides in innate immunity. *Integr Comp Biol* 43:300–304. doi:[10.1093/icb/43.2.300](https://doi.org/10.1093/icb/43.2.300)
- Hancock REW (2001) Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis* 1:156–164. doi:[10.1016/S1473-3099\(01\)00092-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00092-5)
- Hancock REW, Chapple DS (1999) Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1317–1323
- Hancock REW, Diamond G (2000) The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol* 8:402–410. doi:[10.1016/S0966-842X\(00\)01823-0](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01823-0)
- Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder J-M (1997) A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 387:861. doi:[10.1038/43088](https://doi.org/10.1038/43088)
- Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder J-M (2001) Isolation and characterization of human-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 276:5707–5713. doi:[10.1074/jbc.M008557200](https://doi.org/10.1074/jbc.M008557200)
- Hoover DM, Rajashankar KR, Blumenthal R, Purii Anu, Oppenheim JJ, Chertov O, Lubkowski J (2000) The structure of human-defensin-2 shows evidence of higher order oligomerization. *J Biol Chem* 275:32911–32918. doi:[10.1074/jbc.M006098200](https://doi.org/10.1074/jbc.M006098200)
- Hoover DM, Chertov O, Lubkowski J (2001) The structure of human-defensin-1. *J Biol Chem* 276:39021–39026. doi:[10.1074/jbc.M103830200](https://doi.org/10.1074/jbc.M103830200)
- Hoover DM, Wu Z, Tucker K, Lu W, Lubkowski J (2003) Antimicrobial characterization of human-defensin 3 derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* 47:2804–2809. doi:[10.1128/AAC.47.9.2804-2809.2003](https://doi.org/10.1128/AAC.47.9.2804-2809.2003)
- Huang L, Wang J, Zhong Z, Peng L, Chen H, Xu Z, Cen P (2006) Production of bioactive human-defensin-3 in *Escherichia coli* by soluble fusion expression. *Biotechnol Lett* 28:627–632. doi:[10.1007/s10529-006-0024-5](https://doi.org/10.1007/s10529-006-0024-5)
- Huang L, Ching CB, Jiang R, Leong SSJ (2008) Production of bioactive human-defensin 5 and 6 in *Escherichia coli* by soluble fusion expression. *Prot Exp Purif* 61:168–174. doi:[10.1016/j.pep.2008.05.016](https://doi.org/10.1016/j.pep.2008.05.016)
- Huang L, Leong SSJ, Jiang R (2009) Soluble fusion expression and characterization of bioactive human-defensin 26 and 27. *Appl Microbiol Biotechnol* 84:301–308. doi:[10.1007/s00253-009-1982-z](https://doi.org/10.1007/s00253-009-1982-z)
- Lehmann J, et al. (2002) Expression of human β -defensins 1 and 2 in kidneys with chronic bacterial infection. *BMC Infect Dis* 20. doi:[10.1186/1471-2334-2-20](https://doi.org/10.1186/1471-2334-2-20)
- Lehrer RI (2004) Primate defensins. *Nat Rev Microbiol* 2:727–737. doi:[10.1038/nrmicro976](https://doi.org/10.1038/nrmicro976)
- Lehrer RI, Ganz T (2002) Defensins of vertebrate animals. *Curr Opin Immunol* 14:96–102. doi:[10.1016/S0952-7915\(01\)00303-X](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(01)00303-X)
- Li X, Gasic K, Cammue B, Broekaert W, Korban SS (2003) Transgenic rose lines harboring an antimicrobial protein gene, Ace-AMP1, demonstrate enhanced resistance to powdery mildew (*Sphaerotheca pannosa*). *Planta* 218:226–232. doi:[10.1007/s00425-003-1093-5](https://doi.org/10.1007/s00425-003-1093-5)
- Li-gang S, Xi-cheng L, You-yong L, Gen-yu W, Wen-mei L (2007) Soluble expression of active human-defensin-3 in *Escherichia coli* and its effects on the growth of host cells. *Chin Med J* 120:708–713
- Mathews M, Jia HP, Guthmiller JM, Losh G, Graham S, Johnson GK, Tack BF, McCray PB (1999) Production of defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. *Infect Immun* 67:2740–2745
- Peng L, Xu Z, Fang X, Wang F, Cen P (2004a) High-level expression of soluble human-defensin-2 in *Escherichia coli*. *Process Biochem* 39:2199–2205. doi:[10.1016/j.procbio.2003.11.011](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.11.011)
- Peng L, Xu Z, Fang X, Wang F, Yang S, Cen P (2004b) Preferential codons enhancing the expression level of human-defensin-2 in recombinant *Escherichia coli*. *Prot Pept Lett* 11:339–344. doi:[10.2174/0929866043406760](https://doi.org/10.2174/0929866043406760)
- Piers KL, Brown MH, Hancock REW (1993) Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria. *Gene* 134:7–13. doi:[10.1016/0378-1119\(93\)90168-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90168-3)
- Porter EM, Ev Dam, Valore EV, Ganz T (1997) Broad-spectrum antimicrobial activity of human intestinal defensin 5. *Infect Immun* 65:2396–2401
- Schibli DJ, Hunter HN, Aseyev V, Stamer TD, Wiencek JM, McCray PB, Tack BF, Vogel HJ (2002) The solution structures of the human-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 277:8279–8289. doi:[10.1074/jbc.M108830200](https://doi.org/10.1074/jbc.M108830200)
- Schneider JJ, Unholzer A, Schaller M, Schäfer-Korting M, Korting HC (2005) Human Defensins. *J Mol Med* 83:587–595. doi:[10.1007/s00109-005-0657-1](https://doi.org/10.1007/s00109-005-0657-1)
- Schöder J-M, Harder J (1999) Human-defensins-2. *Int J Biochem Cell Biol* 31:645–651. doi:[10.1016/S1357-2725\(99\)00013-8](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(99)00013-8)
- Schutte BC, Mitros JP, Bartlett JA, Walters JD, Jia HP, Welsh MJ, Casavant TL, Paul B, McCray J (2002) Discovery of five conserved-defensin gene clusters using a computational search strategy. *PNAS* 99:2129–2133. doi:[10.1073/pnas.042692699](https://doi.org/10.1073/pnas.042692699)
- Schwaab M, Hansen S, Pearson MD, Shagdarsuren S, Dazert S (2009) Human-defensins—at the front line of the peritonsillar abscess. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. doi:[10.1007/s10096-008-0695-z](https://doi.org/10.1007/s10096-008-0695-z)
- Song W, Shi Y, Xiao M, Lu H, Qu T, Li P, Gang Wu Tian Y (2009) In vitro bactericidal activity of recombinant human-defensin-3 against pathogenic bacterial strains in human tooth root canal. *Int J Antimicrob Agents* 33:237–243. doi:[10.1016/j.ijantimicag.2008.05.022](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.05.022)
- Terpe K (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to Commercial Systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 72:211–222. doi:[10.1007/s00253-006-0465-8](https://doi.org/10.1007/s00253-006-0465-8)
- Valore EV, Ganz T (1997) Antibacterial peptide protocols. In: W-M Shafer (ed) *Methods in molecular biology* (1 edn). Humana Press Inc., Tokowa, NJ, USA
- Valore EV, Park CH, Quayle AJ, Wiles KR, Paul B, McCray J, Ganz T (1998) Human-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest* 101:1633–1642. doi:[10.1172/JCI1861](https://doi.org/10.1172/JCI1861)

- Vargues T et al (2009) Efficient production of human-defensin 2 (HBD2) in *Escherichia coli*. *Prot Pept Lett* 16:668–676. doi:[10.2174/092986609788490122](https://doi.org/10.2174/092986609788490122)
- Wang F, Fang X, Xu Z, Peng L, Cen P (2004) Fusion expression of human-defensin-2 from multiple joined genes in *Escherichia coli*. *Prep Biochem Biotechnol* 34:215–225. doi:[10.1081/PB-200026797](https://doi.org/10.1081/PB-200026797)
- Wei Q, Kim YS, Seo JH, Jang WS, Lee IH, Cha HJ (2005) Facilitation of expression and purification of an antimicrobial peptide by fusion with baculoviral polyhedrin in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 71. doi:[10.1128/AEM.71.9.5038-5043.2005](https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5038-5043.2005)
- Wong JH, Xia L, Ng TB (2007) A review of defensins of diverse origins. *Curr Prot Peptide Sci* 8:446–459. doi:[10.2174/138920307782411446](https://doi.org/10.2174/138920307782411446)
- Wu Z, Hoover DM, Yang D, Boulègue C, Santamaria F, Oppenheim JJ, Lubkowski J, Lu W (2003) Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human-defensin 3. *PNAS* 100:8880–8885. doi:[10.1073/pnas.1533186100](https://doi.org/10.1073/pnas.1533186100)
- Xu Z, Peng L, Zhong Z, Fang X, Cen P (2006a) High-level expression of a soluble functional antimicrobial peptide, human-defensin 2, in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog* 22:382–386. doi:[10.1021/bp0502680](https://doi.org/10.1021/bp0502680)
- Xu Z, Zhong Z, Huang L, Peng L, Wang F, Cen P (2006b) High-level production of bioactive human-defensin-4 in *Escherichia coli* by soluble fusion expression. *Appl Microbiol Biotechnol* 72:471–479. doi:[10.1007/s00253-005-0287-0](https://doi.org/10.1007/s00253-005-0287-0)
- Zasloff M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415:389–395. doi:[10.1038/415389a](https://doi.org/10.1038/415389a)



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Protein Expression and Purification

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yprep

Bacterial expression and antibiotic activities of recombinant variants of human β -defensins on pathogenic bacteria and *M. tuberculosis*

Ligia Corrales-García^{a,b}, Ernesto Ortiz^a, Julio Castañeda-Delgado^c, Bruno Rivas-Santiago^c, Gerardo Corzo^{a,*}

^a Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 61500, Mexico

^b Departamento de Alimentos, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

^c Medical Research Unit-Zacatecas, Mexican Institute of Social Security IMSS, Zacatecas, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 January 2013

and in revised form 16 February 2013

Available online 1 March 2013

Keywords:

Antimicrobial peptides

Human β -defensins

Protein expression

Peptide yields

Mycobacterium tuberculosis

ABSTRACT

Five variants of human β -defensins (HBDs) were expressed in *Escherichia coli* using two vector systems (pET28a(+) and pQE30) with inducible expression by IPTG. The last vector has not been previously reported as an expression system for HBDs. The recombinant peptides were different in their lengths and overall charge. The HBDs were expressed as soluble or insoluble proteins depending on the expression system used, and the final protein yields ranged from 0.5 to 1.6 mg of peptide/g of wet weight cells, with purities higher than 90%. The recombinant HBDs demonstrated a direct correlation between antimicrobial activity and the number of basic charged residues; that is, their antimicrobial activity was as follows: HBD3-M-HBD2 > HBD3 = HBD3-M = HB2-KLK > HBD2 when assayed against *E. coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Interestingly, HBD2 had the best antimicrobial activity against the *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv (1.5 μ M) and the heterologous tandem peptide, HBD3-M-HBD2, had the best minimal inhibitory concentration (MIC) value (2.7 μ M) against a multidrug resistance strain (MDR) of *M. tuberculosis*, demonstrating the feasibility of the use of HBDs against pathogenic *M. tuberculosis* reported to be resistant to commercial antibiotics.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Since the mass-production of penicillin was achieved in the 1940s, the synthesis and use of distinctive antibiotics have had an important impact upon human health. However, bacteria are constantly developing different mechanisms for generation of drug resistance, and it is indeed a phenomenon that presently occurs with pathogenic and non-pathogenic microorganisms [1,2]. The emergence of antibiotic-resistant strains has very often made bacterial infections difficult to treat with the available antibiotics. The growing number of multi-resistant bacteria has become a public health problem, which has motivated scientific research leading to the discovery and formulation of existing natural antibiotics. Antimicrobial peptides such as defensins represent an interesting antibiotic alternative since they take part in the host's natural first-line of host defense against bacterial infections. They are broadly found in plants, insects, reptiles, birds and mammals [3–5]. Among them, human β -defensins (HBDs) have been reported

and considered part of the immune system [6]. Many of these HBDs have been discovered using computational techniques applied to the human genome sequence [6] and have been shown to exhibit a broad antimicrobial activity spectrum with a low susceptibility to generate bacterial resistance [7–9]. HBDs are cationic peptides containing three antiparallel β -strands stabilized by three conserved disulfide bridges [10] that provide a compact small structure [11]. Some of them, also possess an α -helix at the N-terminal region [12]. Similar to other antimicrobial peptides, the principal function of HBDs is to control bacterial growth by either affecting their surrounding membrane surface, as in the case of HBD2 and HBD3 [13], or by acting into phagolysosomes (HBD1) [14]. Therefore, HBDs are endogenous antibiotics with broad bacteriocidal activity toward Gram-positive and Gram-negative bacteria that also inhibit the growth and development of fungi [11,15], capsulated viruses and protozoa [5,11,15,16]. Consequently, HBDs are considered alternative antimicrobial agents that could be used in therapeutics, food preservation and constitute prototypes of novel antibiotic drugs. Nevertheless, in order to study the antibacterial activities of HBDs and their mechanisms of action, it is imperative to produce sufficient amounts of active isoforms. One of the bacterial expression systems used to produce and study HBDs is *Escherichia coli*. However, the heterologous expression of HBDs in

* Corresponding author. Address: Institute of Biotechnology-UNAM, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico. Tel.: +52 777 317 1209; fax: +52 777 317 2388.

E-mail address: corzo@ibt.unam.mx (G. Corzo).

bacteria have had several biochemical problems associated with the intrinsic toxicity or the product toward the host cell, the degradation of the expressed peptide by proteolytic enzymes and the challenges associated with the over-expression of small proteins in *E. coli* [17]. Obtaining recombinant proteins in the form of inclusion bodies offers a feasible solution for HBDs production.

The purpose of this communication is to describe two expression systems for producing HBD2, HBD3 and HBD variants using *E. coli*, with relatively good protein yields. Along with the originally reported HBD2 and HBD3, three other HBDs variants were constructed and expressed. One of them contains an additional triplet (HBD2-KLK) meant to increase the cationic charge of HBD2. HBD3-M was built with the addition of a methionine residue for permitting further chemical cleavage, and the heterologous dimer HBD3-M-HBD2 was constructed to observe the biological activity of tandem HBDs. In this report, we also show that recombinant HBDs are effective against pathogenic microorganisms, and as an original scientific information, we found that they also inhibit the growth of drug resistance strains of *Mycobacterium tuberculosis*. We believe that this communication could help researchers to develop novel ideas in the field of HBDs, and certainly, it would provide innovative antimicrobial peptides for the treatment of bacterial infections, including tuberculosis.

Material and methods

Strains, vectors and enzymes

The expression and maintenance bacterial strains used were *E. coli* BL21(DE3) (*F*⁻; *ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B); m_B⁻) λ (DE3 [*lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5*]), *E. coli* M15[pREP] (*F*⁻, *NaIS*, *StrS*, *RifS*, *Thi*⁻, *Lac*⁻, *Ara*⁺, *Gal*⁺, *Mtl*⁻, *RecA*⁺, *Uvr*⁺, *Lon*⁺) and *E. coli* DH5 α (*fhuA2* Δ (*argF-lacZ*)U169 *phoA glnV44* Φ 80 Δ (*lacZ*)M15 *gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*). The vectors used were pET28a(+) (N-terminal histidine tag, T7 promoter, kanamycin resistance) (Novagen, Madison, WI, USA), pQE30 (N-terminal histidine tag, T5/lac promoter, ampicillin resistance) (QiaGen, Hilden, Germany), pBluescriptKS(+), pGEM (Promega, Madison, WI, USA). Vent and Taq polymerases and restriction enzymes were from New England Biolabs (NEB, Ipswich, MA, USA), T4 Ligase from Fermentas (Carlsbad, CA, USA). DNA purification systems from QiaGen (Hilden, Germany). The High Pure Plasmid Isolation Kit from Roche (Penzberg, Germany). The Ni-NTA Agarose also from QiaGen. All bacterial cultures were grown in 2 \times YT medium (1.7% tryptone, 1% yeast extract, 0.5% sodium chloride).*

The bacterial strains used for HBDs assays were *E. coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). They were purchased directly from the American Type Culture Collection through The Global Bioresource Center™ by UNAM.

Genes and vectors constructs

The protein sequences of HBD2 and HBD3 were obtained from the Protein Data Bank (PDB: 1FD3 and PDB: 1KJ6, respectively). Sequences and their variations were designed using synthetic oligonucleotides (Table S1). The restriction sequence for *Bam*HI and *Pst*I were introduced in oligonucleotides forward (Up-1) and reverse (Lw-4), respectively. The oligonucleotides sequences were adjusted to comply with the preferential codon usage of *E. coli* according to <http://www.kazusa.or.jp/codon>. In order to obtain the pure peptides free from any protein fusion, the coding sequence for the recognition site for Factor Xa protease or an ATG codon for methionine (cleavage by cyanogen bromide CNBr) were introduced in the constructs right downstream the *Bam*HI restric-

tion site. Genes were assembled *in vitro* by “oligonucleotide overlapping extension” using Polymerase Chain Reaction (PCR). In brief, constructs were assembled as follows: overlapping oligonucleotides (Up-1 plus Lw-2, reaction one; Up-3 plus Lw-4, reaction two), with complementary 3' sequences (20 nt) were mixed, annealed and amplified by PCR using Vent-Pol, generating two megaprimers. The PCR products were run on 1% agarose gels containing ethidium bromide and visualized under ultraviolet (UV) light (DNA marker from NEB). Afterwards, the amplification products were purified from the agarose gel with QIAquick Gel extraction kit (QiaGen). Those megaprimers had complementary ends between them. Running a third PCR with Vent-Pol, using Up-1, Lw-4 and the two new oligonucleotides, the whole gene was assembled and subsequently purified from an agarose gel. The blunt-end construct was ligated into the pBluescriptKS(+) plasmid, previously digested with *Eco*RV. The plasmids containing the new construct were introduced into *E. coli* DH5 α by heat shock transformation. The blue/white selection system of the pBluescriptKS(+) plasmid allowed us to select fourteen white colonies that were tested by colony PCR using oligonucleotides T7 (GCGTAATACGACTCACTATA) and T3 (CTCACTAAAGGGAACAAAAGC). Four colonies with the expected DNA size were sequenced at the facilities of the Institute of Biotechnology, UNAM, Mexico. A colony containing the correct sequence was cultured in 5 mL of 2 \times YT broth with 200 μ g/mL of ampicillin. The plasmid was extracted using High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) and then subjected to restriction with *Bam*HI and *Pst*I (NEB) and the obtained fragment was purified from agarose gel and then subcloned into the expression plasmid pQE30, previously digested with the same restriction enzymes. Colonies were tested by colony PCR using oligonucleotides Fp-30 and Rp-30 (Table S1), and finally sequenced. Starting from accurate constructs of HBD2 and HBD3 in plasmid pQE30, the non-natural variants were generated by site-directed mutagenic PCRs. HBD2 was also subcloned into the pET28a(+) vector, through the *Bam*HI and *Hind*III cloning sites. Local homology searches were performed on a personal computer using BLASTN (NCBI) program to assess and confirm the expected primary structures.

Protein production and purification

The host strains *E. coli* M15 [pREP4] or BL21 (DE3) were transformed with the desired construct intended for expression. A monoclonal colony from a fresh transformation was taken to inoculate 5 mL of 2 \times YT broth with ampicillin (200 μ g/mL) and/or kanamycin (30 μ g/mL) in accordance to plasmid-borne resistance, and incubated over night at 37 °C and 180 rpm. Subsequently, 1 mL of the grown culture was used to inoculate 25 mL of 2 \times YT broth with the required antibiotic (same concentration as before) and was incubated during two hours, at 37 °C and 180 rpm. After the incubation, the 25 mL culture was used to inoculate 500 mL of 2 \times YT liquid medium in baffled flasks with the needed antibiotic and incubate at 37 °C and 180 rpm. When the optical density (600 nm) reached a value of 1.3–1.5, the heterologous protein expression was induced with isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG) (Fermentas) at concentrations of 0.1 mM for constructs in pET28a(+) and 1 mM for those in pQE30. At this point, ampicillin was replenished in both expression systems. The induction was carried out at 20 °C for pET28a(+) and 30 °C for pQE30 and lasting 4 h or 8 h, respectively. After induction times, the cells were harvested by centrifugation at 7000g for 15 min and resuspended in Tris-HCl 0.05 M pH 8 buffer. The cells were then disrupted using lysozyme (1 mg/mL) and an ultrasonic disrupter. The insoluble and soluble fractions were separated by centrifugation (7000g for 60 min). Tricine SDS-Page polyacrylamide gels (16% separator/4% stacking gels) were used during the different process steps to determine the presence of the expressed protein after Coomassie brilliant blue stain. Western-blot analysis was con-

ducted after Tricine SDS–PAGE gel by transferring to nitrocellulose membranes and revealing the His-tagged peptides with Anti-His-Peroxidase antibody (Roche). Fractions containing the expressed peptide was treated with 6 M guanidine chloride (GndHCl, Sigma, St. Louis, MO, USA) in a 0.05 M Tris buffer, pH 8.0 and after 2 h incubation, centrifuged at 7000g for 40 min in a refrigerated Beckman Coulter Avanti J-30I centrifuge (Beckman Coulter, Inc., Brea CA, USA). The HBDs contained in the supernatants were purified using immobilized metal affinity chromatography (IMAC) with ni-nitrilotriacetic acid (Ni–NTA) column, according to the instructions from the manufacturer (Qiagen), using denaturing conditions with buffer A (6 M GndHCl in a 0.05 M Tris–base buffer, pH 8.0) and buffer B (6 M GndHCl in 0.05 M Tris–base buffer, containing 400 mM imidazole, pH 8.0). The samples were reduced with 10 mM of 1,4-dithioerythriol (DTT, Sigma). The reduced peptides were purified by reverse-phase HPLC. A semipreparative C₁₈ reverse-phase column (Cosmosil C₁₈, 5 μ m, 120 Å , 10 \times 250 mm) was run from solvent A (0.1% trifluoroacetic acid –TFA– in water) and solvent B (0.1% TFA in acetonitrile) using a gradient from 20% to 60% solvent B, during 40 min at flow rate of 2 mL/min. The recombinant protein was further purified using an analytical column (Vydac C₁₈, 5 μ m, 300 Å , 4.6 \times 250 mm) using the same gradient at a flow rate of 1 mL/min. The recombinant defensin was vacuum dried. Then, 500 μ g of cysteine reduced recombinant defensin was resuspended with 2 mL of 6 M GndHCl (pH 2) followed by the addition of 1.8 and 0.36 mg GSH and GSSG, respectively. The acidic solution of the reduced defensin was further dilute to 6 mL with 3 mL of distilled water and 1 mL of 0.3 M Tris buffer, pH 8.0. So, the recombinant product was allowed to fold for 24 h a room temperature under the final solution of 2 M GndHCl in 0.05 M Tris buffer, pH 8.0, containing 1 mM reduced glutathione (GSH)/0.1 mM oxidized glutathione (GSSG). The molecular masses of the recombinant HBDs were further confirmed by mass spectrometry (LCQ Fleet Ion Trap, Thermo Scientific, Barrington, IL, USA). Finally, recombinant HBDs were freeze-dried, stored at –20 °C and reserved for subsequent analysis. Concentration of each peptide was determined by absorbance at 280 nm using their respective molar extinction coefficients.

Antimicrobial activity assay

The antimicrobial activity of the expressed HBDs was determined by radial diffusion assays as described in Lehrer et al. [18]. Briefly, bacteria were grown in full-strength trypticase soy broth (TBS, Fluka, St. Louis, MO, USA) for 18 h at 37 °C. To obtain a mid-logarithmic phase culture, 50 μ L from the culture were withdrawn to inoculate 50 mL of fresh TSB. After 2.5 h at 37 °C, bacterial cultures were centrifuge at 900g for 10 min, the cells were washed twice with 15 mL of 10 mM sodium phosphate buffer (NaPB) pH 7.4, centrifuged again and resuspended in 10 mL of the same cold buffer. The optical density of the culture was measured at 620 nm; based on the relation: 0.2 OD equals to 5 \times 10⁷ CFU/mL, a volume containing 1 \times 10⁶ CFU, was thoroughly mixed to 10 mL of warm sterilized culture medium 1 (10 mM NaPB, 0.03% w/v of powder TSB, 1% w/v of low electroendosmosis-type agarose (IBI Scientific, Peosta, IA, USA) and 0.02% v/v Tween 20 (Sigma, St. Louis, MI, USA) and poured into Petri dishes (15 \times 100 mm) in a perfectly leveled platform, to shape a uniform 1 mm deep layer. A 3 mm diameter gel punch was used to make seven evenly spaced wells. After adding 5 μ L of HBD samples, a positive or a negative control in different wells, the plates were incubated for 3 h at 37 °C and then overlaid with 10 mL of medium 2 (double strength of TSB medium (6% w/v) and 1% w/v of low electroendosmosis-type agarose). After 18–24 h incubation the diameter of the clear zone surrounding the wells was measured. Ampicillin (5 μ g per well) was used as positive control. In addition, the minimum inhibitory concentration (MIC) in media culture

broth, was determined in ELISA plates (96-well plates), using the same described procedure, but without agarose.

M. tuberculosis assay

The resazurin microtiter assay (REMA) plate method was conducted to determine *M. tuberculosis* susceptibility. Resazurin is an oxidation–reduction indicator and has been used to assess viability, bacterial contamination and to test for antimicrobial activity [19]. The H37Rv (ATCC 27294) and a clinically isolated multidrug resistant (MDR) strain were used in these experiments. The REMA plate method was performed in 7H9 medium containing 10% of OADC (oleic acid, albumin, dextrose and catalase) (Becton–Dickinson, Sparks, MD, USA). Resazurin sodium salt powder (Sigma) was prepared at 10% (wt/vol) in distilled water and filter-sterilized (0.22 μ m). Two-fold serial dilutions of each recombinant HBD in 100 μ L of 7H9–OADC medium were added directly in 96-well plate at concentrations ranging from 96.2 to 0.3 μ g/mL. Ethambutol and Rifampicin were used as positive controls. The *M. tuberculosis* inoculum was prepared from a 14-day logarithmic phase culture and adjusted to the McFarland number of 1 (0.76 OD, 600 nm) with 7H9–OADC medium, and then diluted to 1:20. 100 μ L of this inoculum were added to each well on the plate (final volume 200 μ L). The plates were covered with proper lids and incubated at 37 °C in a normal atmosphere. After 5 days of incubation, 20 μ L of the resazurin solution were added to each control well only, and incubated for 24 h at 37 °C for color development. If color was developed as expected (pink for microorganism's control growth and blue for sterility control), 20 μ L of the resazurin solution were added into each well containing the HBD peptides at different concentrations. After 24 h, a change from blue color to pink color indicated the reduction of resazurin and therefore bacterial growth. The minimal inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest peptide concentration that prevented the reduction of resazurin and therefore a color change from blue to pink. Previous studies by our group suggest that some host defense peptides may induce dormancy or a bacteriostatic state in *M. tuberculosis*. To examine this, 10 μ L from the lowest concentration that did not reduce resazurin were serially diluted and seeded onto 7H10 agar plates supplemented with Middlebrook OADC enrichment media and incubated for at least 21 days at 37 °C, to observe if Mtb regrowth occurred. All antimicrobial tests were conducted in triplicate.

Hemolytic activity

Human erythrocytes were used to evaluate the hemolytic or cytotoxic activity of the HBDs. Erythrocytes, obtained from blood samples from a healthy informed donor, were concentrated by centrifugation (800g) and then washed four times with 5 mM of Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.4 to remove human serum. The erythrocyte pellet was resuspended in PBS buffer and their concentration adjusted to 10⁷ cells/mL. 200 μ L of such erythrocyte suspension were incubated with 2.5–50 μ M of each HBD for 60 min at 37 °C. The cell suspension was centrifuged for 5 min at 1000g and the absorbance of the supernatant was measured at 595 nm. Erythrocyte lysis obtained from Triton X-100 (10% solution) was taken as 100% of hemolysis, whereas erythrocytes incubated in PBS (pH 7.4) served as negative control. The hemolytic and antimicrobial peptide Pin2 from the venom of the African scorpion *Pandinus imperator* [20] was used as positive control. All experiments were performed in triplicate.

Statistics

One-way ANOVA and Tukey analysis procedure, which performs an analysis of variance to test whether or not the means of two or

more samples are equal when comparing two or more conditions, were employed. The software Origin 8[®] (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) and GraphPad Prisma[®] (GraphPad, La Jolla, CA, USA) were used for statistical analysis. A *P*-value of 0.05 was considered as significant. Data are expressed as means with standard deviation (\pm SD).

Results

Genes and vector constructs

The genes coding for HBD2 and HBD3 were successfully amplified by synthetic oligonucleotides (Table S1). As expected, the PCR products were 153 bp and 165 bp for HBD2 and HBD3, respectively, which include the restriction and Factor Xa recognition sites. They were cloned first in pBluescriptKS(+) (pKS-HBD2 and pKS-HBD3), and then the sub-cloning process was performed in pQE30 yielding the pQE30-HBD2 and pQE30-HBD3 plasmids, which were the templates for constructing the other HBD variants. For example, the pQE30-HBD2-KLK (coding for the variant with an insertion of three amino acids, KLK, in the alpha-helix region of HBD2, between positions 7 and 8 inside the natural amino acid sequence) was derived from pQE30-HBD2; the pQE30-HBD3-M (with a methionine addition between the recognition site for Factor Xa and the first residue of the mature HBD3) came from pQE30-HBD3; and the tandem gene construct pQE30-HBD3-M-HBD2 was engineered to obtain the HBD3 joined to the HBD2 by a short flexible peptide (G₄M) (Fig. 1A) using pQE30-HBD3 as well as pQE30-HBD2. Since the expression of the HBD2 and HBD2-KLK genes within the pQE30 plasmid did not yield any significant amount of recombinant protein, they were sub-cloned from pQE30 to pET28(a+) providing the constructs pET28-HBD2 and pET28-HBD2-KLK (Fig. 1B). The amino acid sequence of the recombinant HBDs and their properties are shown in Table 1.

Recombinant expression of HBD3, HBD3-M and HBD3-M-HBD2

The pQE30 plasmids (T5/lac promoter) containing the constructs HBD3, HBD3-M or the tandem HBD3-M-HBD2 (Fig. 1A) were expressed using the strain *E. coli* M15[pREP] strain in 2xYT broth supplemented with 200 μ g/mL ampicillin and 30 μ g/mL kanamycin. The cell growth was conducted at 37 °C and 180 rpm until an optical density of 1.3 (600 nm) and afterwards, the induction of the host cell were performed using IPTG (1.0 mM) for 8 h at 30 °C and 180 rpm. Bacterial cells were harvested and disrupted. The insoluble and soluble fractions were separated and analyzed by Tricine SDS-PAGE. The recombinant HBD3, HBD3-M and HBD3-M-HBD2 were located in the insoluble fraction as inclusion bodies (Fig. 2A). The presence of the recombinant HBDs was confirmed by Western blot analysis (Fig. 2B). The inclusion bodies from insoluble fraction were solubilized with GdnHCl and separated by IMAC-Ni-NTA; the elution fractions were reduced and subjected to RP-HPLC (C₁₈) until a pure peptide was obtained (Fig. 2C) and again evaluated by Tricine SDS-PAGE and Western blot (Fig. 2A and B lanes 6 and 7, respectively). After ESI-MS analysis the molecular masses of the reduced and oxidized forms were completely in accordance with the expected values for each peptide. The molecular weight of the reduced HBD3 and HBD3-M were 7015.4 (Fig. 2D) and 7146.3 Da, respectively, and 11,809.9 Da for the oxidized HBD3-M-HBD2. The production yield of all recombinant HBDs was determined after the purification steps (Table 2). Cells expressing HBD3 and HBD3-M-HBD2 yielded 5 g/L of wet weight biomass each, meanwhile cells expressing HBD3-M were 6 g/L. After extraction and purification of HBDs, it was feasible to determine the steps in which there was major loss. The yield of HBD3, HBD3-M and HBD3-M-HBD2 decreased after the GdnHCl solubilization of the insoluble fraction and IMAC-Ni-NTA purification (Table 2). It could also be noticed that for HBD3, the recombinant peptide yield underwent a reduction from 25% (IMAC-Ni)

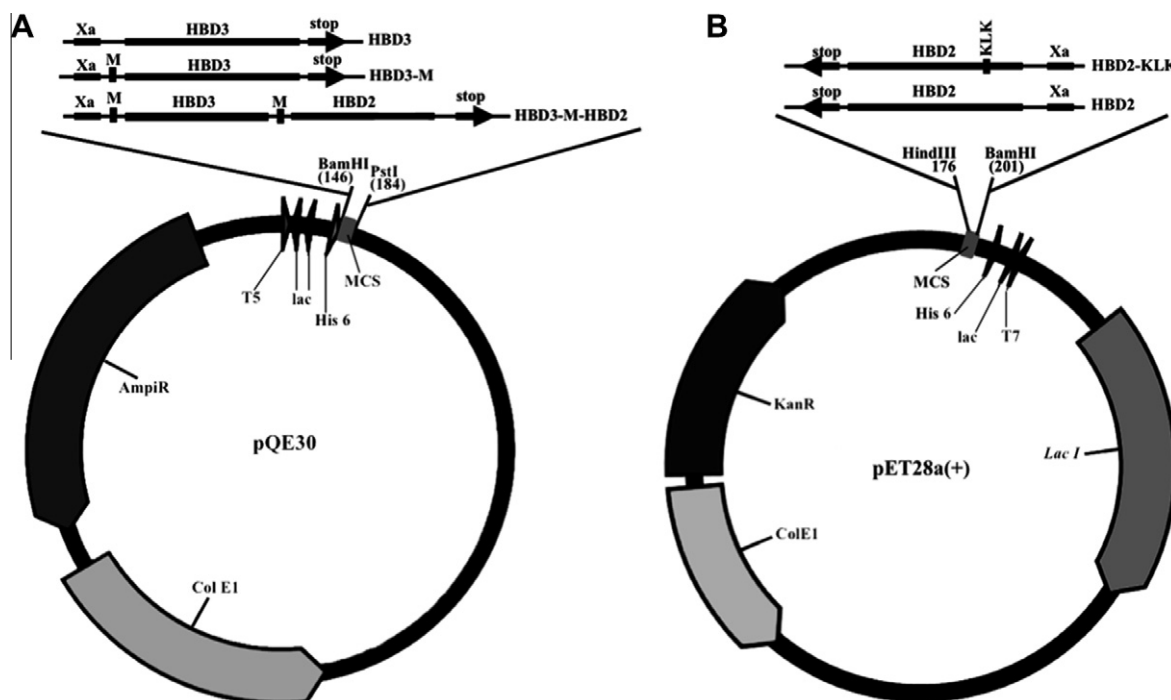


Fig. 1. Plasmid constructs showing their landmarks and schematic representations of the gene constructs. (A) Plasmid pQE30 with HBD3, HBD3-M and HBD3-M-HBD2. (B) Plasmid pET28a(+) with HBD2 and HBD2-KLK.

Table 1
Recombinant HBDs and their properties.

Name	Human β -defensins mature sequences	Vector	Length (aa)	MW (Da)	Charges (-/+)
HBD2	GIGDPVTCLKSGAICHVPVFCPRRYKQIGTCGLPGTKCKKKP	pET28(a+)	41 ^a 79 ^b	4,334.2 ^a 8,202.4 ^b	1/7 ^a 2/10 ^b
HBD3	GIINTLQKYYCRVRRGRCVLSCLPKKEEQIGKCSRGRKCCRKK	pQE30	45 ^a 61 ^b	5,161.2 ^a 7,015.2 ^b	2/13 ^a 3/15 ^b
HBD3-M	MGIINTLQKYYCRVRRGRCVLSCLPKKEEQIGKCSRGRKCCRKK	pQE30	46 ^a 62 ^b	5,292.3 ^a 7,146.3 ^b	2/13 ^a 3/15 ^b
HBD2-KLK	GIGDPVTCLKCLKSGAICHVPVFCPRRYKQIGTCGLPGTKCKKKP	pET28(a+)	44 ^a 82 ^b	4,704.4 ^a 8,571.9 ^b	1/9 ^a 2/12 ^b
HBD3-M-HBD2	GIINTLQKYYCRVRRGRCVLSCLPKKEEQIGKCSRGRKCCRKKGG GGMGIGDPVTCLKSGAICHVPVFCPRRYKQIGTCGLPGTKCKKKP	pQE30	91 ^a 108 ^b	9,836.8 ^a 11,822.0 ^b	3/20 ^a 4/22 ^b

^a Molecular weights and peptide of the natural HBDs.

^b Molecular weights and peptide charges of the expressed HBDs. Expression in plasmid pET28(a+) adds 38 aa (4 kDa) to each HBD. Expression in plasmid pQE30 adds 16 aa (1.9 kDa) to each HBD.

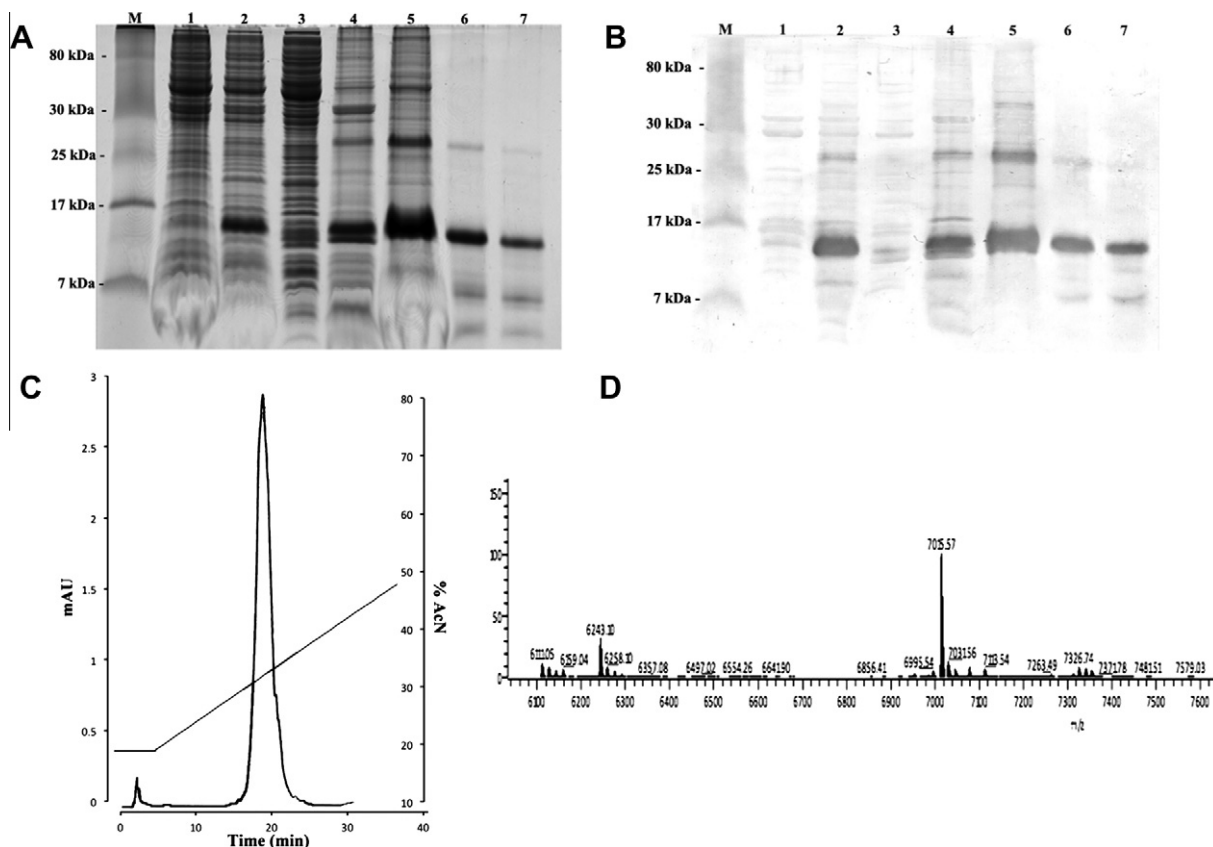


Fig. 2. Expression and purification of the HBD variants from the vector pQE30. (A) Tricine SDS–PAGE of HBD3-M-HBD2 after Coomassie staining (20 μ g of total protein loaded in lanes 1–5, and 2 μ g in lanes 6 and 7). The gel was analyzed and quantified with ChemiDoc MP Imaging System. Lanes: M- Molecular Weight Marker; 1 – Cells before induction; 2 – Cells after induction; 3 – Soluble fraction; 4 – Insoluble fraction; 5 – IMAC purification; 6 – Semi-preparative RP-HPLC; 7 – Analytic RP-HPLC. (B) Western blot analysis of HBD3-M-HBD2. Detection of recombinant peptide was performed with Peroxidase-coupled anti-His6 antibodies (10 μ g of total protein were loaded in lanes 1–5, and 0.5 μ g in lanes 6 and 7). (C) Analytic HPLC purification of HBD3. Retention time was 18.7 min (33.7% AcN). (D) Mass spectrometry analysis of HBD3. The expected molecular mass was 7,015.2 kDa and the obtained molecular mass was 7,015.6 kDa.

4.8% (semi-preparative RP-HPLC), which represents the major loss of product when the same purification steps for the other HBDs are compared (Table 2). After analytical purification, the final yields for HBD3, HBD3-M and HBD3-M-HBD2 were 3.4, 9.5 and 5.5 mg/L, which correspond to an apparent HBD recovery of 4.3%, 10.9% and 9.4%, respectively, with an overall purity of ca 90%. Analyzing the quantities obtained after semi-preparative and analytical RP-HPLC, it could be deduced that the second HPLC purification step is not needed (see Fig. 2B and Table 2).

Expression of HBD2 and HBD2-KLK

The constructs of HBD2 and HBD2-KLK, in pET28a(+) plasmid (T7 promoter), were expressed using the strain *E. coli* BL21 strain

(Fig. 1B). The cell growth was conducted at 37 °C under agitation at 180 rpm until the culture reached an optical density of 1.3 (600 nm). The induction of the host cells was performed using IPTG (0.1 mM) at 20 °C and 180 rpm for 4 h. After cell collection, disruption and centrifugation, the insoluble and soluble fractions were obtained and analyzed by Tricine SDS–PAGE. All expressed peptides were in the soluble fractions (Fig. 3A). The apparent molecular weights obtained by Tricine SDS–PAGE the gel, were slightly lower than the expected ones; however, the presence of recombinant HBDs was confirmed by Western blot analysis (Fig. 3B). In order to obtain the pure peptides, an RP-HPLC separation using a C₄ analytical column was conducted (Fig. 3C) and the products confirmed by Tricine SDS–PAGE (Fig. 3A and B, lane 6). After mass spectrometry analysis, the molecular weights were completely in

Table 2
Purification steps and yields of recombinant HBDs.

Peptide	Purification step	Total protein ^a (mg/L)	Recombinant HBD ^{ab} (mg/L)	Yield (%)	Purity ^b (%)
HBD3	Crude lysate ^c	576 ± 43	80 ± 20	100	16 ± 3
	Crude extract (insoluble)	436 ± 10	66 ± 3	82.5	15.1 ± 0.6
	IMAC-Ni	61.3 ± 8	20 ± 0.9	25	32.7 ± 3
	HPLC-S (C ₁₈)	4.2 ± 0.4	3.8 ± 0.5	4.8	89.3 ± 3
	HPLC-A (C ₁₈)	3.8 ± 0.4	3.4 ± 0.4	4.3	89.6 ± 3
HBD3-M	Crude lysate ^d	572 ± 59	87 ± 14	100	15.5 ± 0.5
	Crude extract (insoluble)	436 ± 10	61.4 ± 9	70.6	14.1 ± 2.2
	IMAC-Ni	42.1 ± 7	18.2 ± 7	21.6	43 ± 5
	HPLC-S (C ₁₈)	16 ± 1	14.8 ± 0.6	17	92.3 ± 3
	HPLC-A (C ₁₈)	10.1 ± 0.7	9.5 ± 0.3	10.9	93.1 ± 3
HBD3-M-HBD2	Crude lysate ^e	380 ± 23	58.3 ± 9	100.0	15.3 ± 4
	Crude extract (insoluble)	111.2 ± 8	26.4 ± 2	45.3	23.7 ± 1
	IMAC-Ni	39 ± 6	20.4 ± 8	35.0	52 ± 8
	HPLC-S (C ₁₈)	8.2 ± 0.4	6.5 ± 0.1	11.1	80 ± 2
	HPLC-A (C ₁₈)	6.2 ± 0.3	5.5 ± 0.1	9.4	90 ± 2
HBD2	Crude lysate ^f	602 ± 90	57.7 ± 8	100.0	9.5 ± 1
	Crude extract (soluble)	446.8 ± 40	39 ± 5	67.6	9.6 ± 2
	IMAC-Ni	71.6 ± 8	20 ± 3	34.7	27 ± 1
	HPLC-A (C ₄)	4.1 ± 0.2	4 ± 0.1	6.9	95.2 ± 4
	Crude lysate ^g	441 ± 41	39.7 ± 10.5	100	9 ± 3
HBD2-KLK	Crude extract (soluble)	386.1 ± 17	28.9 ± 2	72.9	10.2 ± 0.6
	IMAC-Ni	33.2 ± 8	7.5 ± 1	18.9	24 ± 4
	HPLC-A (C ₄)	3.2 ± 0.5	3 ± 0.4	7.6	92 ± 1.2

^a Protein concentration determined by BCA using BSA as standard protein.

^b Target protein as estimated by PAGE densitometry with ChemiDoc System (BioRad).

^c From 5 ± 0.1 g of wet weight *E. coli* cell pellet from 1 L culture (*n* = 3).

^d From 6 ± 0.4 g of wet weight *E. coli* cell pellet from 1 L culture (*n* = 3).

^e From 5 ± 0.3 g of wet weight *E. coli* cell pellet from 1 L culture (*n* = 3).

^f From 6 ± 0.2 g of wet weight *E. coli* cell pellet from 1 L culture (*n* = 6).

^g From 6 ± 0.3 g of wet weight *E. coli* cell pellet from 1 L culture (*n* = 5).

accordance with the expected ones for each HBD expressed in pET28a(+); that is, the reduced molecular mass of HBD2 and HBD2-KLK, were 8202.4 (Fig. 3D) and 8571.9 Da, respectively. The yields of HBD2 and HBD2-KLK after each step of separation are shown in Table 2. The harvested cells represented 6 g/L of wet biomass for both expressed proteins HBD2 and HBD2-KLK. Similar to the expression in pQE30, a major recombinant HBD yield reduction was appreciable after the soluble fraction treatment and the IMAC-Ni-NTA purification (Table 2). Ultimately, 4 and 3 mg/L of HBD2 and HBD2-KLK, respectively, were recovered from the expressions in plasmid pET28(a+).

Antibacterial activity of HBDs

HBD3, HBD3-M and HBD3-M-HBD2 showed minimal inhibitory concentrations (MIC) at 2.5, 2.5 and 4.6 μM for *E. coli*, *S. aureus* and *P. aeruginosa*, respectively (Fig. 4A and B) in solid media. The less active HBDs were HBD2 and HBD2-KLK, with MICs of 10 and 2.5 μM for *E. coli*, 40 and 20 μM for *S. aureus*, and 80 and 40 μM for *P. aeruginosa*, respectively. These results demonstrate a direct correlation between the improvement of antimicrobial activity with the increase in the number of basic charged residues; that is, the antimicrobial activity was better for HBD3-M-HBD2 > HBD3 = HBD3-M = HBD2-KLK > HBD2. The results showed similar values when the antimicrobial tests were performed in culture broth (Table 3). These assays were performed registering the cell growth (absorbance at 600 nm) for 8 h in the presence of HBDs (Fig. 4C). The antimicrobial activity of HBD3-M-HBD2 was the best of all HBDs tested, demonstrating a combined effect of two HBDs.

Activity of HBDs against *M. tuberculosis*

The results found in the *M. tuberculosis* tests were quite different from those observed in the antimicrobial assays against *E. coli*, *S. aureus* and *P. aeruginosa*. Here, HBD3 and HBD3-M showed

equal activity against both strains of *M. tuberculosis*, but were less effective when compared to the other HBDs (Table 4). Interestingly, HBD2 displayed the best bactericidal activity against strain H37Rv (1.5 μM); whereas, HBD3-M-HBD2 showed the worst MIC value (6.8 μM) against H37Rv, but the best MIC value (2.7 μM) against the multidrug resistance strain (MDR). Although the MIC values of the HBDs against the strain H37Rv were worse than those of the commercial antibiotics, their MIC values against the MDR strain were much better, thus demonstrating the feasibility of the use of HBDs against pathogenic strains that have acquired resistance to several commercial antibiotics.

Hemoglobin release by recombinant HBDs

HBDs cytotoxicity against eukaryotic cells was evaluated on human erythrocytes by measuring the release of hemoglobin at different peptide concentrations (Fig. 5). The highest HBD hemolytic activity was 1.2% at 50 μM (HBD2), which it is not significant (*P* < 0.05) compared to the hemolysis shown in the presence of the positive controls, Triton X-100 and the antimicrobial peptide Pin2, being 92% and 100%, respectively. Therefore, these results indicate the low hemolytic or cytotoxic role of recombinant HBDs. This fact is important when considering the use of recombinant HBDs as an alternative source of novel peptide antibiotics.

Discussion

Different strategies have been established to obtain antimicrobial peptides (AMPs) including the isolation from natural sources, chemical synthesis and expression by means of recombinant techniques. The first two approaches exhibit more inconveniences because of the limited amounts of AMPs found in natural sources and the complexity of their purification, and the high cost of chemical peptide synthesis. Thus, the recombinant expression of AMPs has become an attractive alternative for their production. Since many

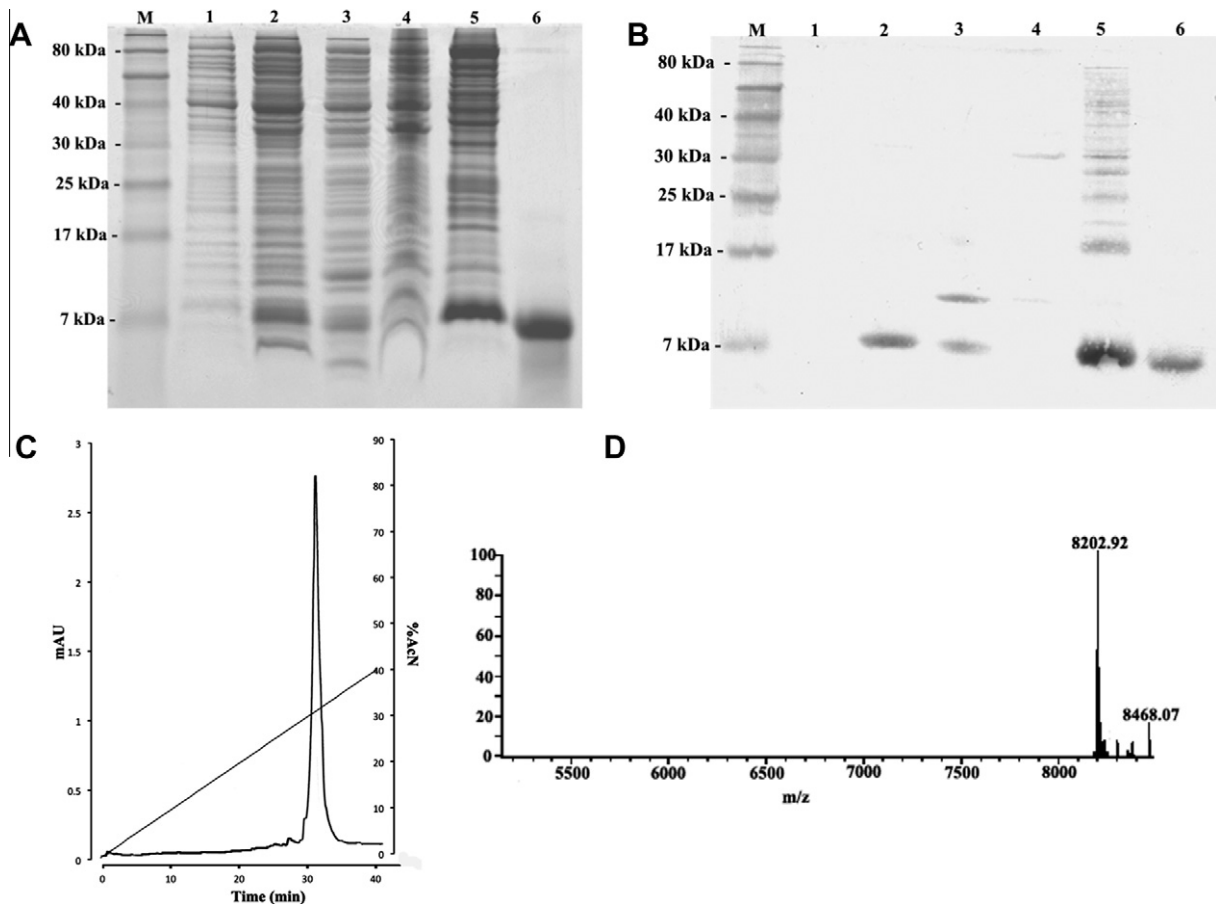


Fig. 3. Expression and purification of HBD variants from the vector pET28a(+). (A) Tricine SDS-PAGE of HBD2 after Coomassie staining (20 μ g of total protein were loaded in lanes 1–5, and 2 μ g in lane 6). The gel was analyzed and quantified with ChemiDoc MP Imaging System. Lanes: M- Molecular Weight Marker; 1 – Cells before induction; 2 – Cells after induction; 3 – Soluble fraction; 4 – Insoluble fraction; 5 – IMAC purification; 6 – Semi-preparative RP-HPLC; 7 – Analytic RP-HPLC. (B) Western blot analysis of HBD2. Detection of recombinant peptide was performed with Peroxidase-coupled anti-His6 antibodies (10 μ g of total protein were loaded in lanes 1–5 and 0.5 μ g in lane 6). (C) Analytic HPLC purification of HBD2. Retention time was 16 min (31% AcN). (D) Mass spectrometry analysis of HBD2. The expected molecular mass was 8,202.2 kDa and the obtained molecular mass was 8,202.9 kDa.

eukaryotic recombinant proteins aggregate to form inclusion bodies when overexpressed in *E. coli*, the recombinant HBDs could be easily isolated from prokaryotic cell extracts.

When considering commercial applications, the expressed protein yield is a factor of utmost importance. In this work the yields of the recombinant HBDs were relatively good, but we faced the same problems that other authors report for small proteins of this kind, namely, their cytotoxicity toward the host cells, sensitivity to proteolytic degradation and low expression levels, mainly because of the small size of these molecules (less than 60 amino acids) [21–25]. Nevertheless, it is possible to attenuate the impact of these limitations on the overall yield. Several procedures have been proposed to reduce some of those adverse effects such to be aware of codon usage; so, in order to improve the protein expression in *E. coli*, or in any other organism, is mandatory to design synthetic genes with preferential codon usage according to the expression system chosen [26–28]. As an example of the impact that the chosen DNA sequence can have on protein yield, the expression level of recombinant HBD2 was increased nine fold as the result of codon optimization, when expressed with thioredoxin as a fusion protein [22,24,26]. Another strategy is to fuse carrier proteins to the target peptide [28–37]. Carrier proteins can usually be expressed at high levels without toxic effects to the cells and they are readily folded. So, it is well documented that carrier proteins increase the amount of the final product, but also at the same time, the yield and biological activity of the wanted recombinant

product (i.e. HBDs) could be diminished after its release from the fusion protein using enzymatic or chemical cleavages [7,22,37,38]. On the other side, it has been noticed that the production yield of some heterologously expressed peptides increases significantly with the decreasing size of the fusion proteins [39]. Hence, it is important to consider an expression system that enables to obtain peptides with only a small increase in their size using a limited number of amino acid residues that would not interfere with the biological activity of the recombinant product, as the ones we are reporting in this communication. We describe a straightforward procedure to obtain active recombinant HBDs using two expression systems, pQE30 and pET28(a+). The former has not been previously considered for the expression of HBDs [22,40]. As can be appreciated from Table 3, the yields for all the expressed HBDs reported in this work were very good. For HBD3, HBD3-M, HBD3-M-HBD2, HBD2 and HBD2-KLK the overall protein yield was 3.4, 9.5, 5.5, 4 and 3 mg/L, respectively, with a purity higher than 90%, as determined by densitometry after PAGE, which provided enough material to conduct biological experiments. At first sight, these yields could seem low compared to those obtained in other reports. For instance, using thioredoxin (Trx) as a carrier protein, the yield of Trx-HBD2 was 346 mg/L [28] and that of Trx-HBD3 was 1 g/L [7]. Nevertheless, it is important to consider that in those reports, neither Trx-HBD2 nor Trx-HBD3, were cleaved or purified from the fusion protein (HBDs represent approximately 20% of whole expressed protein), and the yields

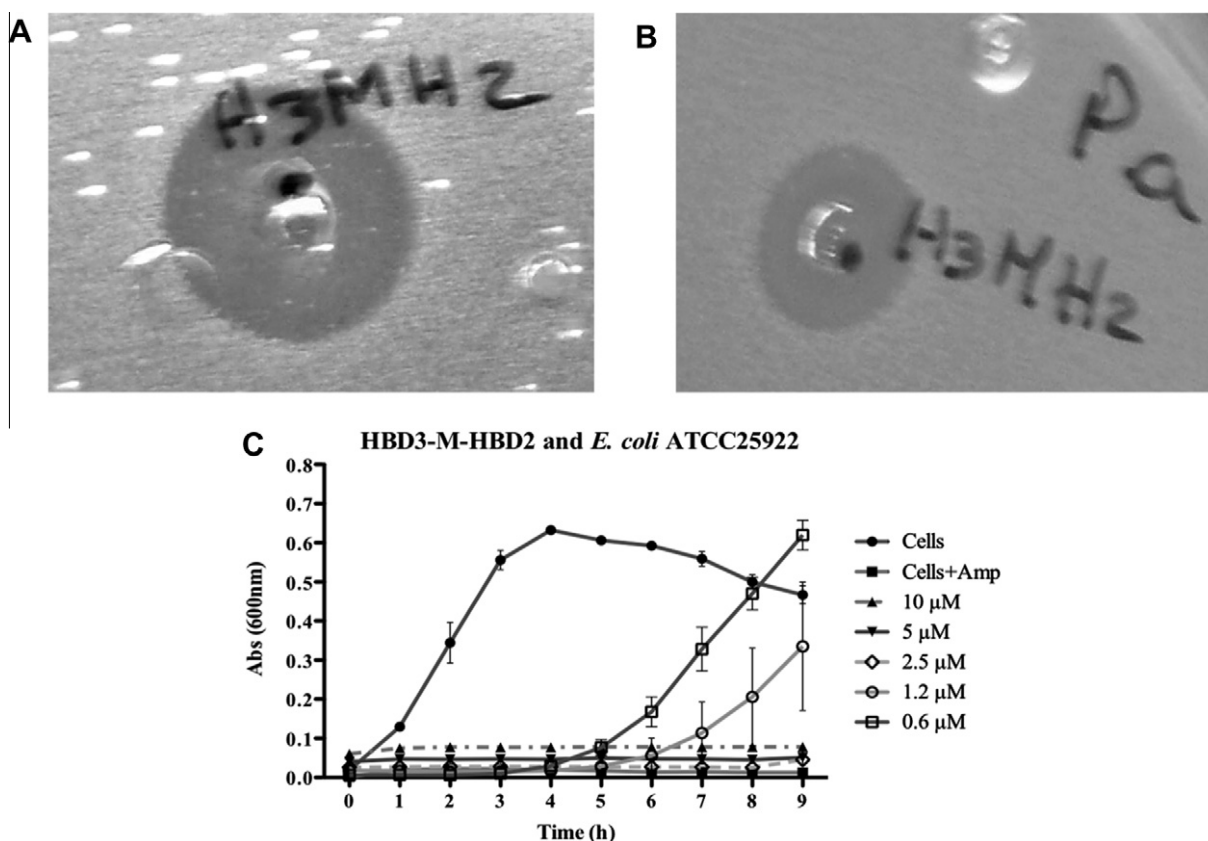


Fig. 4. Antimicrobial activities of recombinant HBD3-M-HBD2. The assays were performed in solid TSB agar medium. Inhibition halos for HBD3-M-HBD2 (160 μM) against *S. aureus* (A) and *P. aeruginosa* (B). Assays in liquid TSB medium against *E. coli*, dilutions range from 10 to 0.6 μM (C).

Table 3
Antimicrobial activities of HBDs in liquid culture media.

Defensin MIC (μM)	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
HBD3	5	5	5
HBD3-M	5	5	5
HBD3-M-HBD2	2.5	2.5	2.5
HBD2	5	10	10
HBD2-KLK	5	5	5

Table 4
Antimicrobial effect of recombinant HBDs against *Mycobacterium tuberculosis* strains H37Rv and MDR.

Defensin	H37Rv		MDR	
	MIC (μg/mL)		MIC (μM)	
HBD3	24	96.2	3.4	13.7
HBD3-M	24	96.2	3.4	13.5
HBD3MHBD2	80.1 ± 24.8	32 ± 12.4	6.8 ± 2.1	2.7 ± 1.0
HBD2	12	40 ± 12.4	1.5	4.9 ± 1.5
HBD2-KLK	ND ^b	ND ^b	ND ^b	ND ^b
Ethambutol ^a	0.5	19.8	2.5	97
Rifampicin ^a	0.4	31.2	0.5	38

Note: When standard deviation is not present, the experiments by triplicate gave the same result.

^a Rastogi et al. (1996).

^b Not determined.

were only estimated by gel imaging. Furthermore, those reports did not assess the purity of their products and did not report the MS analysis of the HBDs to confirm their identity and/or integrity.

Previous reports have shown that the presence of basic charges and hydrophobic residues may significantly improve the capacity of interaction with membranes and the biological properties of AMPs, including HBDs, over some pathogens [21,41,42]. Other reports have suggested that the presence of positively charged amino acids, surrounded by non-polar residues in α-helices, can generate greater antimicrobial activity [41]. Based on the sequence comparison between HBD2 and HBD3, which only share 35% residue homology but are structurally similar, it was found that HBD3 has more positive charges in the N-terminal α-helical region, similar to other biologically active peptides [43,44]. So we decided to take the approach to increase the number of positively charged residues at the N-terminal α-helical region for HBD2 and determine whether this increase resulted in improved bactericidal properties of this HBD against Gram-positive bacteria. We introduced the triplet KLK (HBD2-KLK) at its N-terminal region. In this study, we have found a better MIC for HBD2-KLK, as compared to HBD2, against microorganisms like *S. aureus* and *P. aeruginosa* (Table 3). It is worth noting that, in spite of the high identity between HBD2 and HBD2-KLK, there were also differences in their recombinant expression levels and biological activity. This could be explained by the increase in the content of Lysine, which is known to affect the expression levels as well as the yield of recovery in some prokaryotic expression systems, especially *E. coli* [35,36].

Most HBDs lose their antibacterial activity almost completely when tested in culture media with high ionic strength; for instance, Mueller-Hinton (MH) broth [10]. This culture medium contains starch, which is negatively charged and most probably interacts with cationic AMPs preventing their biological activity. Some researchers have used a quarter strength MH broth to perform antibiotic assays in order to obtain low MIC values (10 μg/

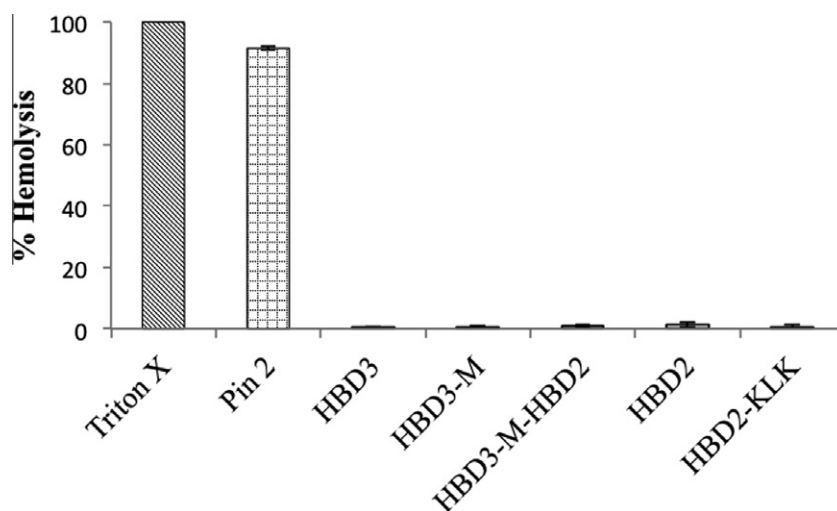


Fig. 5. Hemolytic activities of the HBD variants. Triton X-100 (10%) and Pin 2 (25 μ M) were used as positive controls. The HBD variants were at 50 μ M. Statistical analysis was performed by One Way ANOVA and evaluated by the Tukey post-test.

mL or 2 μ M HBD3 [10]). When the regular concentration of MH is used the MICs increase to more than 300 μ g/mL (which is equivalent to 60 μ M HBD3) for the cationic peptides [10]. The MIC values for HBD3 against various microorganisms have been reported. For example, the work of Garcia et al. (2001) demonstrated that synthetic HBD3 (40 residues and 4662.6 Da) showed a strong antimicrobial activity against *P. aeruginosa* PAO 1 (26.5 μ g/mL or 6 μ M), *E. coli* (6.6 μ g/mL or 1.5 μ M) and *S. aureus* ATCC 25923 (more than 26.5 μ g/mL which is more than 6 μ M). On the other hand, Harder et al. (2001) found that the HBD3 (5161.2 Da) protein concentration necessary to kill 90% of *S. aureus* (ATCC 6538) was 2.5 μ g/mL (0.5 μ M) when a culture of 8×10^4 cells/mL of *S. aureus* was used. This is a cellular concentration almost two orders of magnitude lower than the one used in our study. While testing the antibacterial activity of HBD3 against *S. aureus*, we found that the MIC value was higher than that reported by Harder et al. (2001), but lower than the one reported by Garcia et al. (2001). Comparing our results, it has been reported that 0.022 μ M HBD2 was able to kill 50% of a *P. aeruginosa* culture [45]. Furthermore, the fusion protein Trx-HBD3 needed more than 25 μ g/mL to prevent the growth of *E. coli* ATCC 25922 [7] and *E. coli* K12 [46], although it was not reported how much more was needed to achieve full growth inhibition. Also, the HBD3 obtained from recombinant expression joined to a GST fusion protein showed an antimicrobial activity of 2.5 μ M against *E. coli* ATCC 25922 [34], and finally, the natural HBD2 isolated from psoriatic scales could inhibit *S. aureus* at 23 μ M [47].

In AMPs, the regions containing hydrophobic residues are essential for antimicrobial activity, but they can also increase the nonspecific binding to eukaryotic membranes and thus their potential hemolytic activity [21,48]. Although all HBDs expressed in this work contained a large number of hydrophobic residues, none of them showed hemolytic activity against human erythrocytes. This contrasts sharply with other AMPs such as Pin2, indolicidin or bactenecin, reported as highly hemolytic [10,20]. Probably, HBDs interact strongly with bacterial cells because their membranes contain large amounts of phospholipids and other negatively charged molecules, which is not the case for mammalian cell membranes. These last are composed of neutral zwitterionic phospholipids with abundant inserted cholesterol units [49].

We took the opportunity to test the potential effect of oligomerization on the antimicrobial activity of the HBDs. This has been proposed as a factor that contributes to the ability of HBDs to disrupt bacterial membranes [10,50]. A large net positive charge of

the molecule facilitates its oligomerization or even a high order multimerization. We constructed, expressed and tested the tandemly assembled HBD3-M-HBD2 that displayed an increased activity with respect to its individual components (Tables 3 and 4). The net charge of the tandem HBD is +18, considerably higher than that of the individual species. This could not only promote its oligomerization, but also enhance the likelihood of its interaction with DNA/RNA, interfering this way with cell processes as transcription and translation [22]. There is a previous report on the expression of HBD2 in the homomeric tandem format, evaluating 2, 4 and 8 consecutive peptide units [51]. The best yield was obtained when two units of HBD2 were expressed as a fusion protein with Trx. Unfortunately the antimicrobial activity of these constructs was not reported. Until now, no report was available on the expression of a heteromeric tandem, as we did for HBD2 and HBD3. Here we demonstrate, the high yield expression of HBD3-M-HBD2 (Fig. 2A and B and Table 2) as well as its effectiveness as an antimicrobial peptide against both common pathogens and *M. tuberculosis* (Fig. 4, Tables 3 and 4).

M. tuberculosis is a Gram-positive bacterium that causes tuberculosis. Approximately one-third of the world's population is infected with *M. tuberculosis*, and more than 10 new cases occur every minute, accounting for 1.4 million annual deaths worldwide [52]. Although the presence of tuberculosis is high in the world population, not all people are infected, and therefore there must exist an immune mechanism that protects against this type of infection, even though the precise mechanism remains unknown. The induction of the expression of the HBD2 gene has been demonstrated when epithelial cells A549 were infected with *M. tuberculosis*. This result suggests that HBD2 from lung epithelial cells may be a component of the innate immune response against *M. tuberculosis* both, in the primary infection, and in the immunopathogenesis of human tuberculosis [53]. Although there are some specific drugs against *M. tuberculosis* such as isoniazid, streptomycin, ethambutol and rifampicin, there is not a complete solution for this medical problem and the increasing resistance of several strains of this bacillus [54]. In this work, the H37Rv (ATCC 27294) and MDR strains were used to evaluate the activity of the recombinant HBDs (Table 4). HBD2 presented the best activity against the former, with a MIC of 1.5 μ M. This value is within the range observed for gentamycin, ethambutol and kanamycin, which are reported to be active at 25, 2.5 and 0.4 μ M, respectively, on H37Rv [52,55]. HBD3-M-HBD2 exhibited the best activity against the MDR strain,

with a MIC of 2.7 μM , well below the reported effective concentrations for traditional antibiotics, 97 μM for ethambutol and 38 μM for rifampicin [55]. Considering that these peptides could prevent biochemical mechanisms of resistance in bacteria, since HBDs act on the membrane leading to multiple stress via several targets [21,56], HBDs may be proposed as prospective drugs [39].

Conclusions

Here we demonstrated that HBDs could be expressed in significant quantities using the pET28(a+) and pQE30 vectors in *E. coli*. We showed that they all have antimicrobial activity against pathogenic bacteria, including H37Rv and MDR strains of *M. tuberculosis*. The recombinant HBDs were active even when fused to short N-terminal peptides and they were not cytotoxic to human erythrocytes. Taken together, our results highlight recombinant HBDs as prospect drug candidates for future therapeutics.

Acknowledgments

We acknowledge MSc. Alejandra Montoya Rosales for their help to perform the anti-tuberculosis assays and to MSc. Timoteo Olamendi for DNA sequencing as well as the Oligonucleotide Synthesis and Proteomic Mass Facilities of our institution. This work has been supported by a grant from DGAPA-UNAM, IN200412 awarded to GC. LLC is a recipient of a PhD scholarship, #229367 from CONACyT.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2013.02.007>.

References

- [1] S. Jovetic, Y. Zhu, G.L. Marcone, F. Marinelli, J. Tramper, β -lactam and glycopeptide antibiotics: first and last line of defense?, *Trends Biotechnol* 28 (2010) 596–604.
- [2] L. Pallecchi, A. Bartoloni, F. Paradisi, G.M. Rossolini, Antibiotic resistance in the absence of antimicrobial use: mechanisms and implications, *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* 6 (2008) 725–732.
- [3] J. Lehmann, M. Retz, J. Harder, M. Krams, U. Kellner, J. Hartmann, K. Hohgräwe, U. Raffenberg, M. Gerber, T. Loch, K. Weichert-Jacobsen, M. Stöckle, Expression of human β -defensins 1 and 2 in kidneys with chronic bacterial infection, *BMC Infect. Dis.* 20 (2002) 1–10.
- [4] R.I. Lehrer, T. Ganz, Defensins of vertebrate animals, *Curr. Opin. Immunol.* 14 (2002) 96–102.
- [5] M. Zasloff, Antimicrobial peptides of multicellular organisms, *Nature* 415 (2002) 389–395.
- [6] B.C. Schutte, J.P. Mitros, J.A. Bartlett, J.D. Walters, H.P. Jia, M.J. Welsh, T.L. Casavant, J. Paul, B. McCray, Discovery of five conserved β -defensin gene clusters using a computational search strategy, *PNAS* 99 (2002) 2129–2133.
- [7] W. Song, Y. Shi, M. Xiao, H. Lu, T. Qu, P. Li, Gang Wu, Y. Tian, In vitro bactericidal activity of recombinant human β -defensin-3 against pathogenic bacterial strains in human tooth root canal, *Int. J. Antimicrob. Agent* 33 (2009) 237–243.
- [8] T. Ganz, Versatile defensins. *Science* 298 (2002) 977–978.
- [9] T. Ganz, The role of antimicrobial peptides in innate immunity, *Integr. Comp. Biol.* 43 (2003) 300–304.
- [10] E. Klüver, S. Schulz-Maronde, S. Scheid, B. Meyer, W.-G. Forstmann, K. Adermann, Structure-activity relation of human β -defensin 3: influence of disulfide bonds and cysteine substitution on antimicrobial activity and cytotoxicity, *Biochemistry* 44 (2005) 9804–9816.
- [11] J.J. Schneider, A. Unholzer, M. Schaller, M. Schäfer-Korting, H.C. Korting, Human defensins, *J. Mol. Med.* 83 (2005) 587–595.
- [12] D.M. Hoover, Z. Wu, K. Tucker, W. Lu, J. Lubkowski, Antimicrobial characterization of human β -defensin 3 derivatives, *Antimicrob. Agent Chemother.* 47 (2003) 2804–2809.
- [13] J. Harder, J. Bartels, E. Christophers, J.-M. Schröder, Isolation and characterization of human β -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 5707–5713.
- [14] J.-M. Schröder, J. Harder, Human β -defensins-2, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31 (1999) 645–651.
- [15] M. Schwaab, S. Hansen, M.D. Pearson, S. Shagdarsuren, S. Dazert, Human β -defensins—at the front line of the peritonsillar abscess, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* (2009) 122.
- [16] M. Mathews, H.P. Jia, J.M. Guthmiller, G. Losh, S. Graham, G.K. Johnson, B.F. Tack, P.B. McCray, Production of β -defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands, *Infect. Immun.* 67 (1999) 2740–2745.
- [17] E.V. Valore, T. Ganz, *Antibacterial Peptide Protocols*, Humana Press Inc. Tokowa, NJ, USA, 1997.
- [18] R.I. Lehrer, M. Rosenman, S.S.S.L. Harwig, R. Jackson, P. Eisenhauer, Ultrasensitive assay for endogenous antimicrobial polypeptides, *J. Immunol. Meth.* 137 (1991) 167–173.
- [19] J.C. Palomino, A. Martin, M. Camacho, H. Guerra, J. Swings, F. Portaels, Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *Antimicrob. Agent Chemother.* 46 (2002) 2720–2722.
- [20] A. Rodríguez, E. Villegas, H. Satake, L.D. Possani, G. Corzo, Amino acid substitutions in an alpha-helical antimicrobial arachnid peptide affect its chemical properties and biological activity towards pathogenic bacteria but improves its therapeutic index, *Amino Acids* 40 (2011) 61–68.
- [21] M. Zorko, B. Japel, I. Hafner-Bratkovič, R. Jerala, Expression, purification and structural studies of a short antimicrobial peptide, *Biochem. Biophys. Acta* 1788 (2009) 314–323.
- [22] Y. Li, Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: a review, *Protein Expr. Purif.* 80 (2011) 260–267.
- [23] J.F. Kane, Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*, *Curr. Opin. Biotechnol.* 6 (1995) 494–500.
- [24] N.A. Burgess-Brown, S. Sharma, F. Sobott, C. Loenarz, U. Oppermann, O. Gileadi, Codon optimization can improve expression of human genes in *Escherichia coli*: a multi-gene study, *Protein Expr. Purif.* 59 (2008) 94–102.
- [25] B.R. Glick, G.K. Whitney, Factors affecting the expression of foreign proteins in *Escherichia coli*, *J. Ind. Microbiol.* 1 (1987) 277–282.
- [26] L. Peng, Z. Xu, X. Fang, F. Wang, S. Yang, P. Cen, Preferential codons enhancing the expression level of human β -defensin-2 in recombinant *Escherichia coli*, *Protein Pept. Lett.* 11 (2004) 339–344.
- [27] L. Peng, Z. Xu, X. Fang, F. Wang, P. Cen, High-level expression of soluble human β -defensin-2 in *Escherichia coli*, *Process Biochem.* 39 (2004) 2199–2205.
- [28] Z. Xu, L. Peng, Z. Zhong, X. Fang, P. Cen, High-level expression of a soluble functional antimicrobial peptide, human β -defensin 2, in *Escherichia coli*, *Biotechnol. Prog.* 22 (2006) 382–386.
- [29] D. Sposito, D.K. Chatterjee, Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags, *Curr. Opin. Biotechnol.* 17 (2006) 353–358.
- [30] I. Cipáková, E. Hostinová, J. Gasperík, V. Velebný, High-level expression and purification of a recombinant hBD-1-fused to LMM protein in *Escherichia coli*, *Protein Expr. Purif.* 37 (2004) 207–212.
- [31] Z. Xu, Z. Zhong, L. Huang, L. Peng, F. Wang, P. Cen, High-level production of bioactive human β -defensin-4 in *Escherichia coli* by soluble fusion expression, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72 (2006) 471–479.
- [32] T. Vargues, G.J. Morrison, E.S. Seo, D.J.C.L. Fielder, J. Bennani, U. Pathania, F. Kilanowski, J.R. Dorin, J.R.W. Govan, C.L. Mackay, D. Uhrin, D.J. Campopiano, Efficient production of human β -defensin 2 (hBD2) in *Escherichia coli*, *Protein Pept. Lett.* 16 (2009) 668–676.
- [33] F. Wang, X. Fang, Z. Xu, L. Peng, P. Cen, Fusion expression of human β -defensin-2 from multiple joined genes in *Escherichia coli*, *Prep. Biochem. Biotechnol.* 34 (2004) 215–225.
- [34] L.G. Si, X.C. Liu, Y.Y. Lu, G.Y. Wang, W.M. Li, Soluble expression of active human β -defensin-3 in *Escherichia coli* and its effects on the growth of host cells, *Chin. Med. J.* 120 (2007) 708–713.
- [35] M. Pazgier, J. Lubkowski, Expression and purification of recombinant human alpha-defensins in *Escherichia coli*, *Protein Expr. Purif.* 49 (2006) 1–8.
- [36] K.L. Piers, M.H. Brown, R.E.W. Hancock, Recombinant dna procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria, *Gene* 134 (1993) 7–13.
- [37] B. Bommarius, H. Jenssen, M. Elliott, J. Kindrachuk, M. Pasupuleti, H. Gieren, K.-E. Jaeger, R.E.W. Hancock, D. Kalman, Cost-effective expression and purification of antimicrobial and host defense peptides in *Escherichia coli*, *Peptides* 31 (2010) 1957–1965.
- [38] L. Zhang, T. Falla, M. Wu, S. Fidai, J. Burian, W. Kay, R.E.W. Hancock, Determinants of recombinant production of antimicrobial cationic peptides and creation of peptide variants in bacteria, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247 (1998) 674–680.
- [39] S.A. Jang, B.H. Sung, J.H. Cho, S.C. Kim, Direct expression of antimicrobial peptides in an intact form by a translationally coupled two-cistron expression system, *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (2009) 3980–3986.
- [40] L.L. Corrales-García, L.D. Possani, G. Corzo, Expression systems of human β -defensins: vectors, purification and biological activities, *Amino Acids* 40 (2011) 5–13.
- [41] Y.S. Kim, H.J. Cha, Disperse distribution of cationic amino acids on hydrophilic surface of helical wheel enhances antimicrobial peptide activity, *Biotechnol. Bioeng.* 107 (2010) 216–223.
- [42] O.L. Franco, Peptide promiscuity: an evolutionary concept for plant defense, *Fed. Eur. Biochem. Soc.* 585 (2011) 995–1000.
- [43] R.E.W. Hancock, D.S. Chapple, Peptide antibiotics, *Antimicrob. Agent Chemother.* 43 (1999) 1317–1323.
- [44] R.E.W. Hancock, G. Diamond, The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences, *Trends Microbiol.* 8 (2000) 402–410.

- [45] P.K. Singh, H.P. Jia, K. Wiles, J. Hesselberth, L. Liu, B.-A.D. Conway, E.P. Greenberg, E.V. Valore, M.J. Welsh, T. Ganz, B.F. Tack, J. Paul, B. McCray, Production of β -defensins by human airway epithelia, *PNAS* 95 (1998) 14961–14966.
- [46] L. Huang, J. Wang, Z. Zhong, L. Peng, H. Chen, Z. Xu, P. Cen, Production of bioactive human β -defensin-3 in *Escherichia coli* by soluble fusion expression, *Biotechnol. Lett.* 28 (2006) 627–632.
- [47] J. Harder, J. Bartels, E. Christophers, J.-M. Schröder, A peptide antibiotic from human skin, *Nature* 387 (1997) 861.
- [48] H.T. Chou, H.W. Wen, T.Y. Kuo, C.C. Lin, W.J. Chen, Interaction of cationic antimicrobial peptides with phospholipid vesicles and their antibacterial activity, *Peptides* 31 (2010) 1811–1820.
- [49] Z. Wu, D.M. Hoover, D. Yang, C. Boulègue, F. Santamaria, J.J. Oppenheim, J. Lubkowski, W. Lu, Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human β -defensin 3, *PNAS* 100 (2003) 8880–8885.
- [50] D.J. Campopiano, D.J. Clarke, N.C. Polfer, P.E. Barran, R.J. Langley, J.R.W. Govan, A. Maxwell, J.R. Dorin, Structure-activity relationships in defensin dimers: a novel link between β -defensin tertiary structure and antimicrobial activity, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 48671–48679.
- [51] Z. Zhong, Z. Xu, L. Peng, L. Huang, X. Fang, P. Cen, Tandem repeat mhbd2 gene enhance the soluble fusion expression of hBD2 in *Escherichia coli*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71 (2006) 661–667.
- [52] R. Kapoor, P.R. Eimerman, J.W. Hardy, J.D. Cirillo, C.H. Contag, A.E. Barron, Efficacy of antimicrobial peptoids against *Mycobacterium tuberculosis*, *Antimicrob. Agent Chemother.* 55 (2011) 3058–3062.
- [53] B. Rivas-Santiago, S.K. Schwander, C. Sarabia, G. Diamond, M.E. Klein-Patel, R. Hernandez-Pando, J.J. Ellner, E. Sada, Human β -defensin 2 is expressed and associated with *Mycobacterium tuberculosis* during infection of human alveolar epithelial cells, *Infect. Immun.* 73 (2005) 4505–4511.
- [54] D. Lemus, E. Montoro, M. Echemendía, S.L. Yzquierdo, A. Martin, F. Portaels, J.C. Palomino, Nuevos métodos para la detección rápida de la resistencia de *Mycobacterium tuberculosis*, *Biotechnol. Appl.* 22 (2005) 306–308.
- [55] N. Rastogi, V. Labrousse, K.S. Goh, In vitro activities of fourteen antimicrobial agents against drug susceptible and resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and comparative intracellular activities against the virulent H37Rv strain in human macrophages, *Curr. Microbiol.* 33 (1996) 167–175.
- [56] C.D. Fjell, J.A. Hiss, R.E.W. Hancock, G. Schneider, Designing antimicrobial peptides: form follows function, *Nat. Rev. Drug Discov.* 11 (2012) 37–51.