



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Inmovilización de péptidos bioactivos en almidón

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Q.A Gina Pacheco Arredondo

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Romina Rodríguez Sanoja
Instituto de investigaciones Biomédicas, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Herminia Loza Tavera
Facultad de Química, UNAM

Dr. Carlos Regalado González
Facultad de Química, UAQ

Ciudad de México. Mayo, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

PMDCB/1365/2015...2a

Gina Pacheco Arredondo
Alumno (a) de la Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

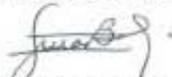
Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 23 de noviembre del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRO (A) EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Inmovilización de péptidos bioactivos sobre almidón**", dirigida por la **Dra. Romina Rodríguez Sanoja**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dra. Amelia Farrés González-Saravia
VOCAL	Dr. Miquel Gimeno Seco
VOCAL	Dr. Sergio Sánchez Esquivel
VOCAL	Dra. Clarita Olvera Carranza
SECRETARIO	Dra. Blanca Estela García Almendárez

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 26 de noviembre de 2015
COORDINADORA DEL SUBCOMITÉ ACADÉMICO



DRA. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO

C.c.p. Tutor
C.c.p. Archivo

BGP*igg

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo económico para la asistencia a congresos.

A CONACyT por la beca de maestría 509303.

A DGAPA-UNAM por el apoyo al proyecto IN222113.

Contenido

Abreviaturas	1
Resumen	3
1. Introducción	5
2. Marco teórico	6
2.1 Péptidos antimicrobianos	6
2.2 Péptido LL-37	7
2.3 Módulos de unión a carbohidratos o CBM	10
2.4 Dominio de fijación al almidón (DFA) de <i>Lactobacillus</i> spp	12
2.5 Almidón	15
3. Justificación	18
4. Hipótesis	18
5. Objetivo general	19
5.1. Objetivos particulares	19
6. Metodología	20
6.1. Estrategia general	20
6.2 Construcción de la proteína recombinante DFA _{tag} LL37	21
6.3 Expresión en <i>E. coli</i> BL21 DE3 pLysS y purificación de LL37 y DFA _{tag} LL37	24
6.4 Expresión en <i>E. coli</i> Rosetta 2 y purificación de LL37 y DFA _{tag} LL37	25
6.5 Pruebas de actividad antimicrobiana contra <i>E. coli</i> K12	25
7. Resultados y discusión	27
7.1 Diseño de la proteína	27
7.2 Clonación y expresión del DFA _{tag} (patente MX/a/2012/005765) en pET22b+	28
7.3. Subclonación y expresión de LL37 en pET22b+	32
7.4. Efecto de la producción de la proteína LL37-His en el crecimiento celular	35
7.5. Purificación de la proteína LL37 por afinidad a níquel	37
7.6. Eliminación de la etiqueta de histidinas del LL37	37
7.7. Construcción y expresión de la proteína DFA _{tag} + LL37	39
7.8 Eliminación de la etiqueta de histidinas del DFA _{tag} LL37	45
7.9. Comparación de costos de purificación y obtención de la proteína activa (LL37 y DFA _{tag} LL37)	48
7.10 Pruebas de actividad antimicrobiana contra <i>E. coli</i> K12	49
8. Conclusiones	57

Bibliografía	59
Apéndices	62
Anexos	72

Abreviaturas

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
°C	Grados Celsius
cm	Centímetros
DO	Densidad óptica
μM	micromol
mM	Milimolar
g	Gramos
h	Horas
KDa	Kilodaltons
μg	Microgramos
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
nm	Nanómetros
pH	Potencial de hidrógeno
PM	Peso molecular
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
U	Unidades enzimáticas
mV	Milivolts
mA	Miliampers
μL	Microlitros
N	Normal
amp	Ampicilina
cam	Cloranfenicol
CBM	Módulo de unión a carbohidrato
DFA_{tag}	Dominio de fijación al almidón patente MX/a/2012/005765
AMP	Péptido antimicrobiano

LL-37	Péptido LL-37 (GB Z38026)
LL37	Péptido obtenido en el trabajo (Linker-LL37)
DFA_{tag}LL37	Proteína de fusión obtenida en el trabajo

Resumen

Los péptidos bioactivos son moléculas pequeñas de origen proteico con una actividad biológica específica, un ejemplo de ellos son los péptidos antimicrobianos, estos tienen entre 20 y 50 aminoácidos (Ramos *et al.*, 2010) y son producidos por una gran cantidad de seres vivos que incluyen bacterias, plantas y mamíferos como una barrera biológica natural (Pinto da Costa *et al.*, 2015). Estos péptidos han sido ampliamente estudiados en los últimos años debido a sus posibles aplicaciones, ya que son capaces de irrumpir en la membrana bacteriana por medio de interacciones no específicas lípido-péptido (Moon *et al.*, 2005) impidiendo que los microorganismos generen resistencia. El péptido LL-37 es producido por el ser humano, tiene una estructura α -hélice de carácter hidrofóbico y catiónico (6+) haciendo posible su interacción con la membrana como se mencionó anteriormente. Este se encuentra en el cuerpo como un zimógeno que bajo ciertas señales es activado para formar parte de la primera línea de defensa (Vandamme *et al.*, 2015).

Por otra parte, en el laboratorio, se ha estudiado un DFA derivado de una bacteria ácido láctica demostrando que este se une fuertemente a gránulos de almidón insoluble aun estando fusionado con otras proteínas, permitiendo a esta segunda mantener su actividad (Guillén *et al.*, 2013).

El objetivo de este trabajo es inmovilizar un análogo del péptido LL-37 en almidón con ayuda de este DFA_{tag} (patente MX/a/2012/005765).

La estrategia empleada para cumplir con el objetivo consistió en el diseño de una proteína que pudiese ser expresada en *E. coli* aun y cuando la misma es tóxica para ella. Por ello se optó por bloquear la proteína del lado carboxilo con 6 histidinas y del amino con el propio dominio que nos permitirá inmovilizarla en almidón, para poder eliminar las histidinas por medio de proteasas el péptido fue modificado sin disminuir su carga neta.

La realización de este trabajo permitió la expresión y purificación a bajo costo e inmovilización de este péptido en almidón insoluble con resultados favorables de actividad antimicrobiana logrando obtener un 75% de inhibición de *E. coli* K12 a una concentración de 47 $\mu\text{g/mL}$ de LL37. Así mismo se observó que la actividad de la proteína DFA_{tag}LL37 se ve disminuida un 40% cuando no está

inmovilizada. Otros descubrimientos, muestran que la proteína LL37 a una concentración de 36 $\mu\text{g}/\text{mL}$ inhibe el 87% del crecimiento de *E. coli* K12. Estos resultados sugieren que la inmovilización de este péptido permitirá el desarrollo de aplicaciones como empaques biodegradables bioactivos que permitan alargar la vida de anaquel de los alimentos, el desarrollo de ungüentos y parches con este péptido que ayudará en lesiones de la piel o enfermedades como rosácea entre otras cosas.

1. Introducción

Los DFA son dominios auxiliares con plegamiento autónomo cuya función es el reconocimiento y adsorción al carbohidrato blanco, que en este caso específico es el almidón insoluble (Boraston *et al.*, 2004). En las amilasas, el DFA tiene tres papeles conocidos: permitir la interacción entre el sustrato insoluble y la enzima en solución; acercar el sustrato al sitio activo del dominio catalítico y en algunos casos desestabilizar la superficie del gránulo de almidón (Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2005).

Recientemente, en el laboratorio se ha explorado el potencial de un DFA derivado de los presentes en las α -amilasas de lactobacilos (DFA_{tag} -patente MX/a/2012/005765) como un domino auxiliar para la inmovilización y purificación de proteínas utilizando como soporte gránulos de almidón o azúcares análogos (Guillén *et al.*, 2013). Dado el uso extensivo del almidón en la industria de alimentos, cosmética y farmacéutica, la propuesta de este trabajo consiste en determinar si es viable utilizar el DFA_{tag} para inmovilizar péptidos antimicrobianos en almidón.

Los péptidos antimicrobianos son producidos de forma natural por un amplio grupo de organismos que incluyen bacterias, plantas, insectos, peces y mamíferos, como una barrera biológica contra otros microorganismos. Para la evaluación del sistema se seleccionó el péptido LL-37, un péptido antimicrobiano de 37 aminoácidos derivado de la catelicidina humana. Estos péptidos desempeñan un papel importante en la inmunidad innata especialmente contra bacterias y contra hongos del género *Candida* (Vandamme *et al.*, 2012). Su producción en forma activa y en grandes cantidades utilizando sistemas heterólogos sigue siendo un reto, razón por la cual uno de los objetivos de este trabajo fue establecer si la fusión con dominios de unión a carbohidrato resulta una estrategia plausible para su expresión y purificación. Además, en este trabajo se evaluó si la fusión del péptido al DFA_{tag} y su posterior inmovilización al almidón interfieren con la capacidad antimicrobiana de LL-37.

2. Marco teórico

2.1 Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos, son pequeñas moléculas de origen proteico que contienen menos de 50 aminoácidos (Ramos *et al.*, 2010). Son sintetizados de manera regular por una gran cantidad de seres vivos, desde bacterias, hongos y levaduras hasta por el humano, así como otros mamíferos y vertebrados, con el objetivo de generar una barrera biológica contra microorganismos (Pinto da Costa *et al.*, 2015). Es interesante que muchos AMPs primero fueron descritos por una segunda función biológica antes que por su actividad antimicrobiana (Reinholz *et al.*, 2010).

El constante incremento de la resistencia a antibióticos de microorganismos patógenos ha obligado a los científicos a buscar alternativas para combatirlos. Una de las más prometedoras es el uso de los AMP, cuyo espectro de acción es amplio, pues además de actuar contra una gran cantidad de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas pueden actuar sobre hongos. Además, para la mayor parte de AMPs descritos, las bacterias no han logrado adquirir un mecanismo de resistencia, probablemente debido a su modo de acción, ya que son capaces de irrumpir en la membrana bacteriana por medio de interacciones no específicas lípido-péptido (Moon *et al.*, 2005). Su carga neta generalmente es positiva y contienen una gran cantidad de residuos hidrofóbicos que les permiten interactuar selectivamente con la membrana bacteriana cargada negativamente y no con las membranas zwitteriónicas de mamíferos.

Los péptidos antimicrobianos se clasifican según su estructura en cuatro grupos: anfipáticos α -hélice (LL-37), hojas- β (defensinas), loops- β (bactenecina) y los AMP extendidos (carecen de estructura, histatinas) (Pinto da Costa *et al.*, 2015).

Actualmente, se han descrito más de dos mil AMP en prácticamente todos los organismos eucariontes. En humanos, la actividad de estos péptidos se demostró en años 60s, al observar que algunas proteínas con carácter catiónico eran las responsables de la capacidad independiente de

oxígeno que los neutrófilos tienen para matar bacterias (Pinto da Costa *et al.*, 2015). Los péptidos más estudiados son las histatinas, las defensinas α y β y el LL37.

2.2 Péptido LL-37

LL-37 (GB Z38026) es un péptido antimicrobiano derivado de la catelicidina humana (Figura 1). Las catelicidinas son proteínas encontradas en los mamíferos con una región altamente conservada entre las diferentes especies y una región variable con capacidad antimicrobiana. Esta región variable es conocida como péptido LL-37. Este péptido contiene 37 residuos y pesa aproximadamente 4.5 kDa. Su carga neta a pH fisiológico es 6+, esta carga proviene de la suma de las cargas positivas de las argininas y lisinas y de las negativas de los ácidos aspártico y glutámico. En individuos sanos su expresión es cercana a los 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la cual se puede incrementar de dos a cuatro veces cuando hay infección (Buick *et al.*, 2010) en células epiteliales del tracto respiratorio, intestino, genitales y ojos, entre otros, formando así la primera línea de defensa contra bacterias (Vandamme *et al.*, 2015).

En otras células, como los queratinocitos, los neutrófilos y las NK (Natural Killer), la catelicidina es producida y almacenada en gránulos. El péptido se activa al ser liberado por escisión de la catelicidina por serin proteasas como la proteinasa 3 y la calicreína, cuando se activan receptores TLR o existe una alteración en las citocinas causada por una infección o daño a tejido por alguna infección bacteriana o por *Candida*. Al ser parte de la primera línea de defensa tiene un amplio espectro de actividad antimicrobiana para bacterias Gram positivas y negativas (Vandamme *et al.*, 2012).

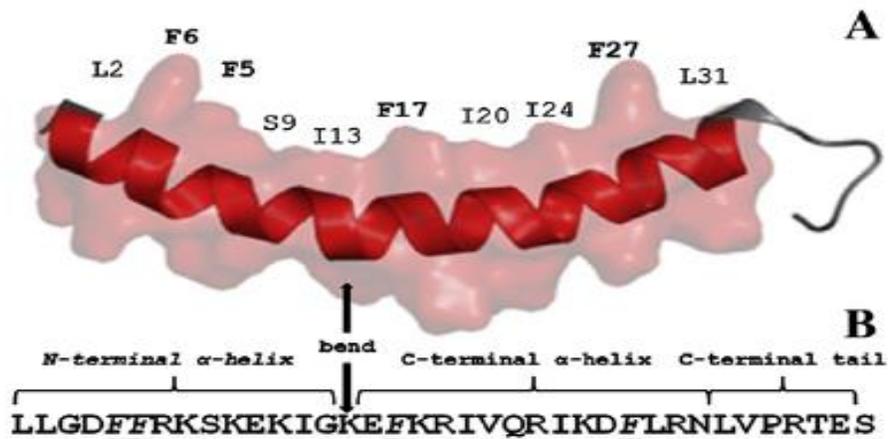


Figura 1. Estructura y secuencia del péptido LL-37. A) estructura tridimensional. B) secuencia de aminoácidos dividido en regiones. Adaptado de Vandamme, *et al.*, 2012.

Se ha demostrado que el extremo C-terminal del LL-37 es el responsable de la actividad antimicrobiana. Este tiene una estructura proteica anfipática y cargada positivamente (6+) con plegamiento de α -hélice. LL-37 interacciona y penetra a la membrana microbiana cargada negativamente provocando así un cambio en la permeabilidad, la formación de poros y la muerte celular (Vandamme *et al.*, 2012, Yang *et al.*, 2004). Como se muestra en la figura 2 el péptido LL-37, al igual que otros AMP de naturaleza catiónica, interactúa con la membrana de distintas maneras, ya sea por atracción a la membrana debido a su carga negativa (A) o a sitios específicos de unión catiónica (B) o desplazándose a la membrana citoplasmática (C) o por translocación para formar poros (D) o internalizándose totalmente en la célula (E, F) (Hancock, Chapple, 1999).

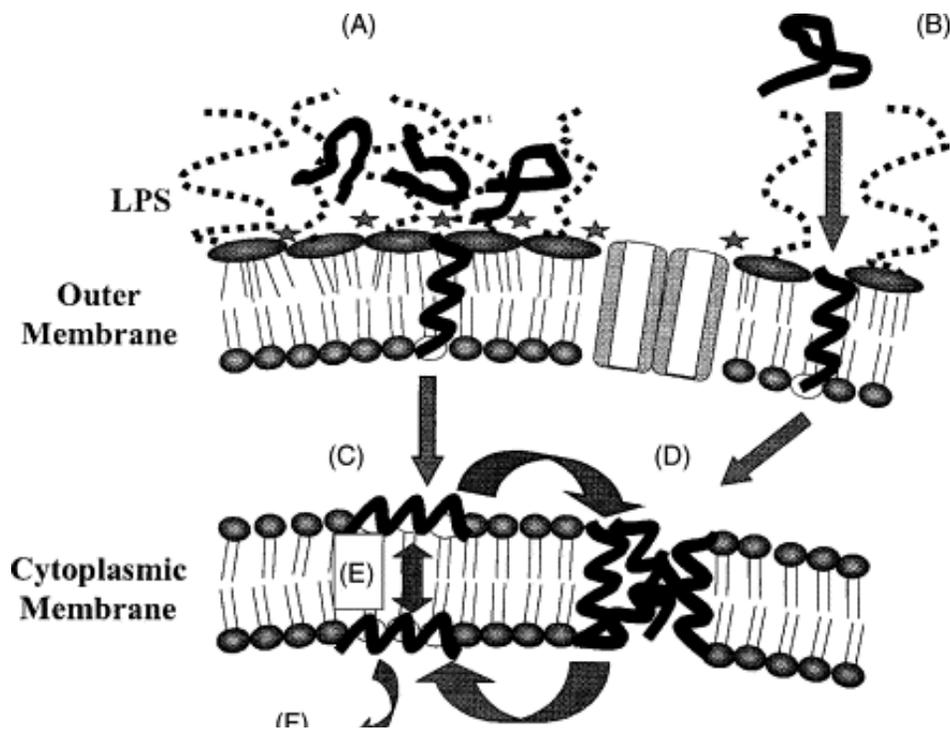


Figura 2. Modelo propuesto para la acción del péptido LL-37 en bacterias Gram negativas. A) los péptidos son atraídos a la membrana cargada negativamente, neutralizan las cargas y generan grietas que les permiten penetrar la membrana externa, B) la unión de los péptidos a los sitios de unión catiónica divalente del lipopolisacárido irrumpe la membrana, C) los péptidos se unen a la membrana citoplasmática cargada negativamente, D) formación de poros para permitir el paso de péptidos a la célula, E) la translocación de los péptidos en la membrana provoca desestabilidad, F) eventualmente algunos péptidos se translocan al citoplasma para posiblemente unirse a DNA o RNA (Hancock, Rozek 2002).

Además de la capacidad antimicrobiana, el LL-37 es un péptido multifuncional esencial para la respuesta inmune ante infecciones y lesiones de tejido. También se han reportado funciones como quimioatractor, inhibición de apoptosis de neutrófilos, estimulación antigénica, regeneración de tejido y liberación de citoquinas (Buick *et al.*, 2010).

Estudios más recientes mencionan que, en ausencia de este péptido se incrementa la susceptibilidad a infecciones virales y bacterianas. En humanos, la expresión disminuida de la catelicidina está asociada con enfermedades de la piel como dermatitis atópica y úlceras crónicas, mientras que está sobre expresada en enfermedades como la psoriasis y rosácea (Vandamme *et al.*, 2012).

2.3 Módulos de unión a carbohidratos o CBMs

Los CBM son dominios proteicos de entre 50 y 200 aminoácidos cuya función específica es la de ayudar a la enzima hidrolítica a unirse al carbohidrato a degradar (Boraston *et al.*, 2006, Guillen *et al.*, 2010). En estudios anteriores, se ha encontrado que, si estas enzimas pierden su CBM, la capacidad de degradación de los sustratos insolubles se ve disminuida y puede incluso perderse completamente (Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2000, Boraston *et al.*, 2004). Actualmente, los CBMs se encuentran clasificados en 71 familias distintas organizadas de acuerdo a su estructura primaria en la base de datos CAZy (Carbohydrate-Active Enzymes database <http://www.cazy.org/Carbohydrate-Binding-Modules.html>).

Los módulos de fijación a carbohidratos se han encontrado tanto en el extremo N-terminal como en el C-terminal de glucósido-hidrolasas o glucósido-transferasas. Se pueden encontrar entre dos módulos catalíticos, de manera individual o en tándem (Abe *et al.*, 2004) (Figura 3). Es importante mencionar que una proteína puede contener varios CBMs con diferente especificidad de unión, dándole a las enzimas mayor oportunidad de degradar diversas fuentes (Boraston *et al.*, 2007).

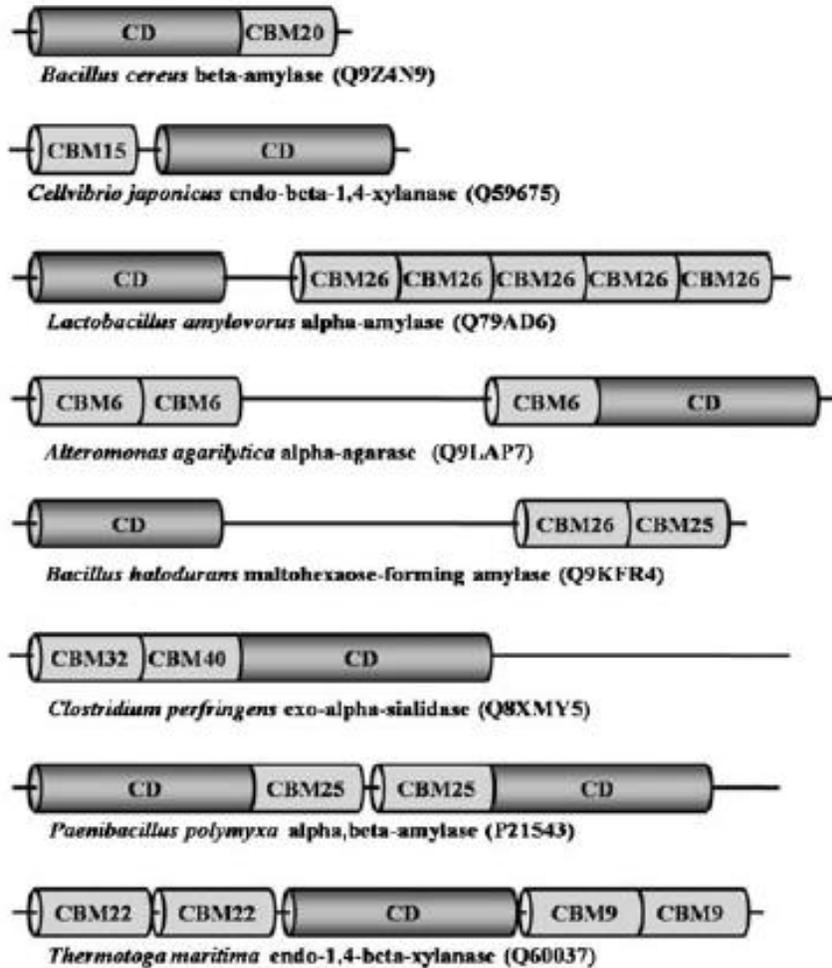


Figura 3. Módulos de fijación a carbohidratos de distintas enzimas glucoamilolíticas (Guillen *et al.*, 2010).

Dentro de la gran variedad de módulos de unión a carbohidratos que existen en la naturaleza se encuentran aquéllos capaces de unir xilano, celulosa, glucógeno, quitina y almidón, entre otros. La base de datos CAZy, actualmente, tiene 10 familias que corresponden a dominios de unión a almidón (<http://www.cazy.org/>, Boraston *et al.*, 2006).

2.4 Dominio de fijación al almidón de *Lactobacillus* spp

Algunos lactobacilos presentes en fermentaciones vegetales son capaces de producir α -amilasas para utilizar el almidón presente en los sustratos. Estas son enzimas multidominio que catalizan la hidrólisis de los enlaces alfa-D-(1,4)-glucosídicos del almidón a oligosacáridos de longitud variable por un mecanismo conocido como catálisis ácida. Generalmente, las α -amilasas comparten una estructura de barril- $(\beta/\alpha)_8$ en el dominio catalítico y solo el 10% de ellas contiene dominios de fijación al almidón o DFAs, siendo más frecuentes las de origen microbiano (Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2005).

Los genes que codifican para las α -amilasas de algunos lactobacilos como *L. manihotivorans*, *L. plantarum* y *L. amylovorus* al ser secuenciados y analizados mostraron un 98% de identidad. La particularidad de esas enzimas es que la mitad 3' está formada por secuencias repetidas, directas e idénticas de 271 nucleótidos. Cuatro secuencias en *L. manihotivorans* y *L. plantarum* con regiones ricas en serinas y treoninas entre cada secuencia y cinco secuencias en *L. amylovorus* sin regiones intermedias, pero si serinas y treoninas flanqueando todo el dominio (Figura 4) (Morlon-Guyotet *et al.*, 2001).

Utilizando como modelo a la α -amilasa de *L. amylovorus* se demostró la capacidad de adsorción al almidón de la región codificada por las secuencias repetidas, pues al eliminarlas, la enzima perdía su capacidad de hidrolizar almidón insoluble aún y cuando mantenía la capacidad de hidrólisis sobre el sustrato soluble (Rodríguez, *et al.*, 2000). Mientras que, por otro lado, la proteína codificada solo por las secuencias repetidas, sin dominio catalítico es capaz de adsorberse fuertemente al almidón (Santiago, *et al.*, 2005). Actualmente cada una de las secuencias repetidas es considerada por sí misma un CBM (Guillén *et al.* 2007) y clasificado en la base de datos CAZy como miembro de la familia CBM26.

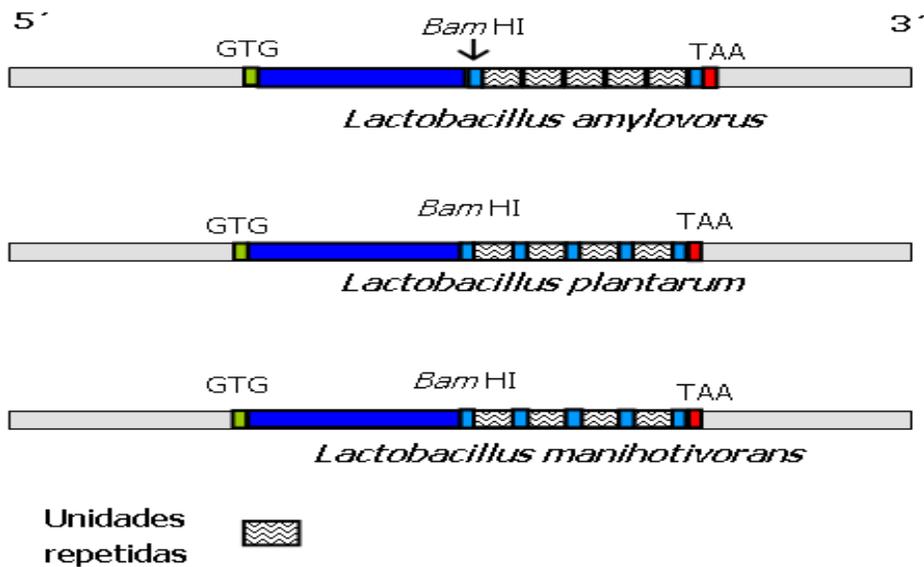


Figura 4: Representación de los genes de las α -amilasas de *L. amylovorus*, *L. plantarum* y *L. manihotivorans*, donde la primera mitad del gen codifica para el dominio catalítico y la segunda para el DFA. El DFA de *L. amylovorus* presenta 5 módulos mientras que los de *L. manihotivorans* y *L. plantarum* contienen 4.

La interacción entre el DFA y el almidón se realiza principalmente a través de aminoácidos aromáticos. La proteína CBM26 de la α -amilasa formadora de maltohexaosa de *Bacillus halodurans* se cristalizó en presencia de maltosa y se observó que las principales interacciones se realizan con los aminoácidos aromáticos tirosina 25 y triptófano 36, los cuales establecen interacciones hidrofóbicas con los anillos de piranosa de la glucosa. La unión se estabiliza a través de puentes de hidrógeno con otros residuos como la tirosina 23, la glutamina 71, glicina 76 y el ácido glutámico 77 (Figura 5). A diferencia de otras familias de CBM que contienen dominios de unión al almidón, los pertenecientes a la familia 26 solamente poseen un sitio de unión (Boraston *et al.*, 2006).

Con esta información se alinearon ambas secuencias y se tomaron aminoácidos candidatos para realizar mutaciones en la secuencia de *L. amylovorus* cambiándolos por leucinas. Posteriormente se realizaron geles nativos con almidón para poder reconocer aquellas mutantes que conservaban la capacidad de unirse al almidón y aquellas que no. Se lograron identificar los aminoácidos clave en

la interacción, siendo dos tirosinas y un triptófano que coinciden con el modelo antes descrito (Rodríguez-Sanoja *et al.*, 2008).

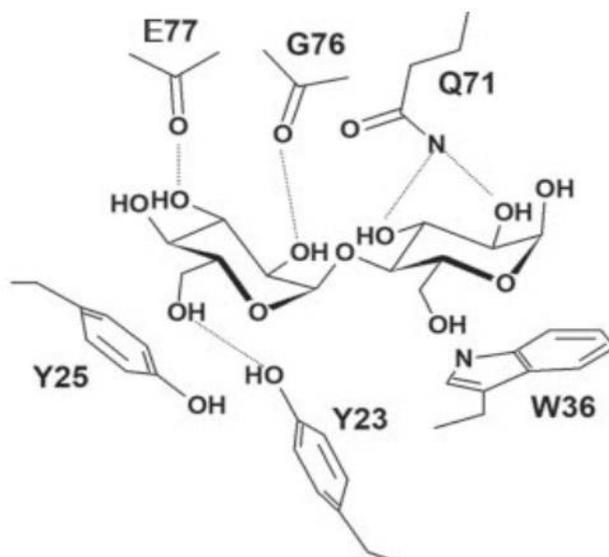


Figura 5. Interacción del CBM26 de la amilasa formadora de maltohexaosa de *B. halodurans* con maltosa (Boraston, *et al.*, 2006).

Otros estudios del laboratorio demostraron que la fusión de proteínas de diferente origen y tamaño con el DFA_{tag} no afecta la función de ninguna de las proteínas en la construcción lo que permitió proponer el uso del DFA_{tag} como una etiqueta para la inmovilización de proteína recombinante (patente MX/a/2012/005765) (Guillén, *et al.*, 2013) (Figura 6).

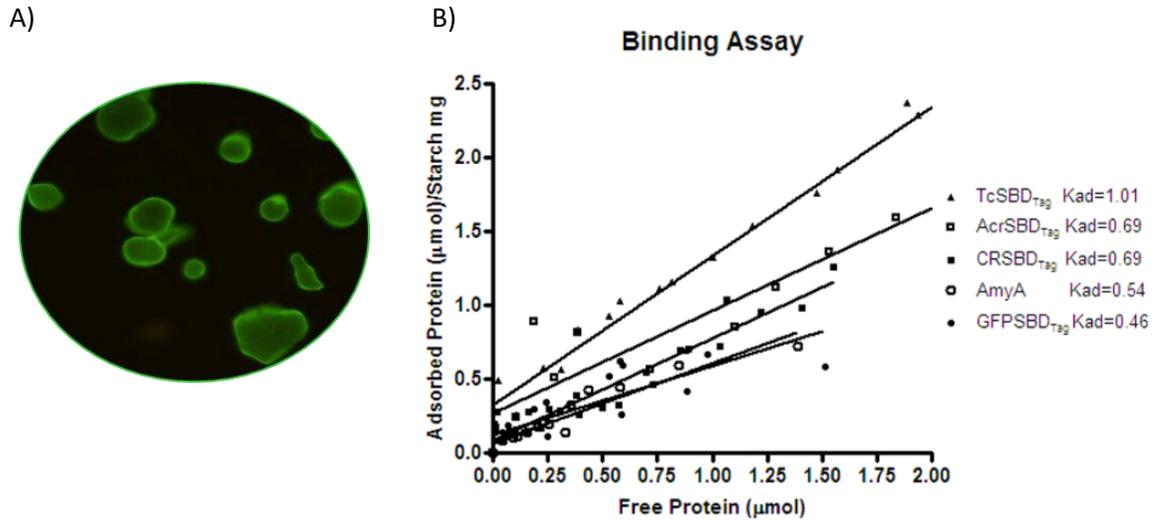


Figura 6. A) microscopia de fluorescencia con GFPDFA en gránulos de almidón. B) ensayo de adsorción de las diferentes proteínas de fusión y la amilasa de *L. amylovorus* (AmyA). *SBD= DFA_{tag} (Guillén *et al.*, 2013)

2.5. Almidón

El almidón es un polisacárido de origen vegetal formado por unidades de glucosa organizadas en dos moléculas distintas, amilosa y amilopectina (Figura 7). La amilosa está formada por moléculas de glucosa unidas por enlaces glucosídicos α -1,4, mientras que, la amilopectina, además de estos también presenta enlaces α -1,6 provocando ramificaciones entre aproximadamente cada 24-30 residuos de glucosa (Boraston *et al.*, 2006).

En cuanto a su estructura espacial, se sabe que los enlaces α -1,4 de ambas moléculas son los responsables de provocar la estructura en espiral, generando gránulos compactos que funcionan eficientemente como reserva energética (Boraston *et al.*, 2006).

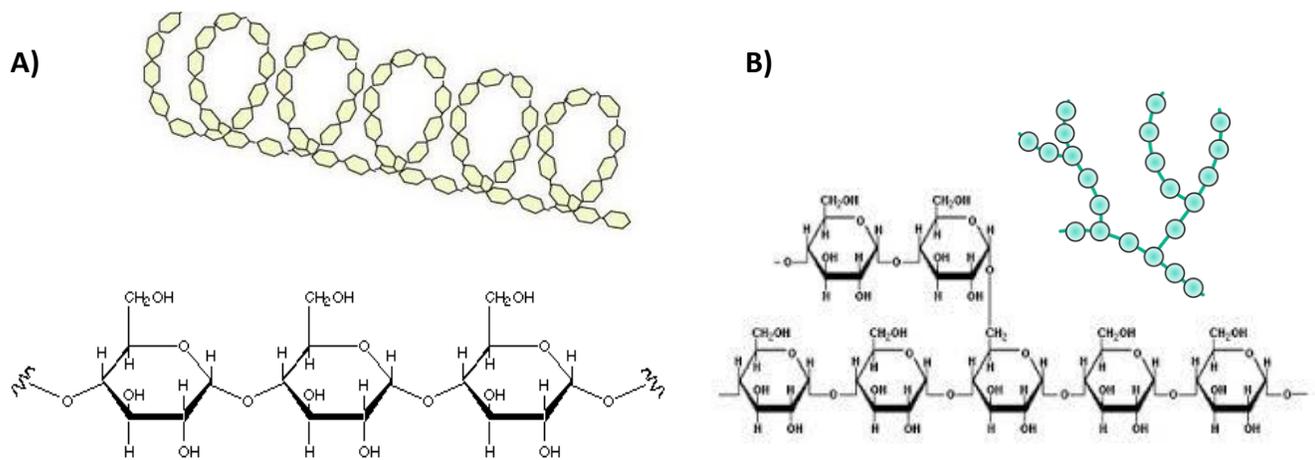


Fig. 7: Representación de los dos polímeros de glucosa que se encuentran en el almidón. A) La amilosa con enlaces α -1,4 y B) La amilopectina con enlaces α -1,4 y ramificaciones unidas a través de enlaces α -1,6.

Dado que el almidón es un polisacárido extremadamente abundante e inocuo tanto para el uso como consumo humano este es ampliamente utilizado en diversos sectores. Algunos de los principales usos del almidón son:

🚧 Industria

- Manufactura de papel
- Pegamentos
- Almidón para textiles
- Bioplásticos obtenidos partir a partir de la degradación del almidón (PLA)
- Sustitución de polímeros a base de hidrocarburos desde un 10% hasta un 90%

🚧 Alimentos

- Azúcares provenientes de la hidrólisis del almidón
- Como espesante o estabilizante
- Algunos almidones modificados no son digeribles por el hombre por lo que son utilizados como fibra

🚧 Farmacia

- Excipiente

- Cosméticos
- Talco

Sabiendo que el DFA_{tag} se une al almidón fuertemente y a su vez es posible fusionarle diversas proteínas manteniendo su funcionalidad, además, del amplio uso del almidón en las industrias es que se despierta el interés por estudiar más sobre este dominio para conocer su potencial.

3. Justificación

En el laboratorio se demostró que el DFA_{tag} (patente MX/a/2012/005765) puede ser fusionado a diferentes proteínas, todas ellas mayores a los 20 kDa. Para ampliar las aplicaciones biomédicas y biotecnológicas del sistema, es importante establecer si la propiedad de adsorción al almidón puede ser transferida a péptidos sin afectar su función biológica, ya que éstos han demostrado tener diversas actividades, como agentes antimicrobianos, antioxidantes, vasodilatadores e incluso, neurotransmisores.

Además, el almidón es un sustrato ampliamente utilizado en distintos campos tecnológicos, por ejemplo, en alimentos como aditivo, en cosmética o farmacéutica como excipiente, en investigación biomédica, en materiales para elaborar plásticos biodegradables, etc. Parte del amplio uso que tiene es debido a sus propiedades de inocuidad, biocompatibilidad, abundancia y bajo costo, lo cual lo hace una matriz de interés para el estudio de otras posibles aplicaciones. Demostrar que un péptido bioactivo es capaz de mantener su función estando unido al almidón aumentaría el potencial de este sistema.

4. Hipótesis

La fusión del AMP LL37 con el DFA_{tag} mantendrá la función biológica de ambas proteínas permitiendo tener la actividad antimicrobiana inmovilizada sobre gránulos de almidón.

5. Objetivo general

Estudiar el efecto de la inmovilización en almidón del péptido LL37 sobre su capacidad antimicrobiana.

5.1. Objetivos particulares

- * Diseñar y construir la proteína recombinante DFA_{tag}LL37 para su expresión heteróloga en *E. coli* Rosetta 2.
- * Obtener las proteínas LL37 y DFA_{tag}LL37 activas.
- * Evaluar la capacidad inhibitoria de la proteína LL37 contra *E. coli* K12 a diferentes concentraciones.
- * Probar la capacidad antimicrobiana de la proteína DFA_{tag}LL37 contra *E. coli* K12, tanto libre como inmovilizada.

6. Metodología

6.1. Estrategia general

En el siguiente diagrama de flujo se describe de manera general la estrategia utilizada.

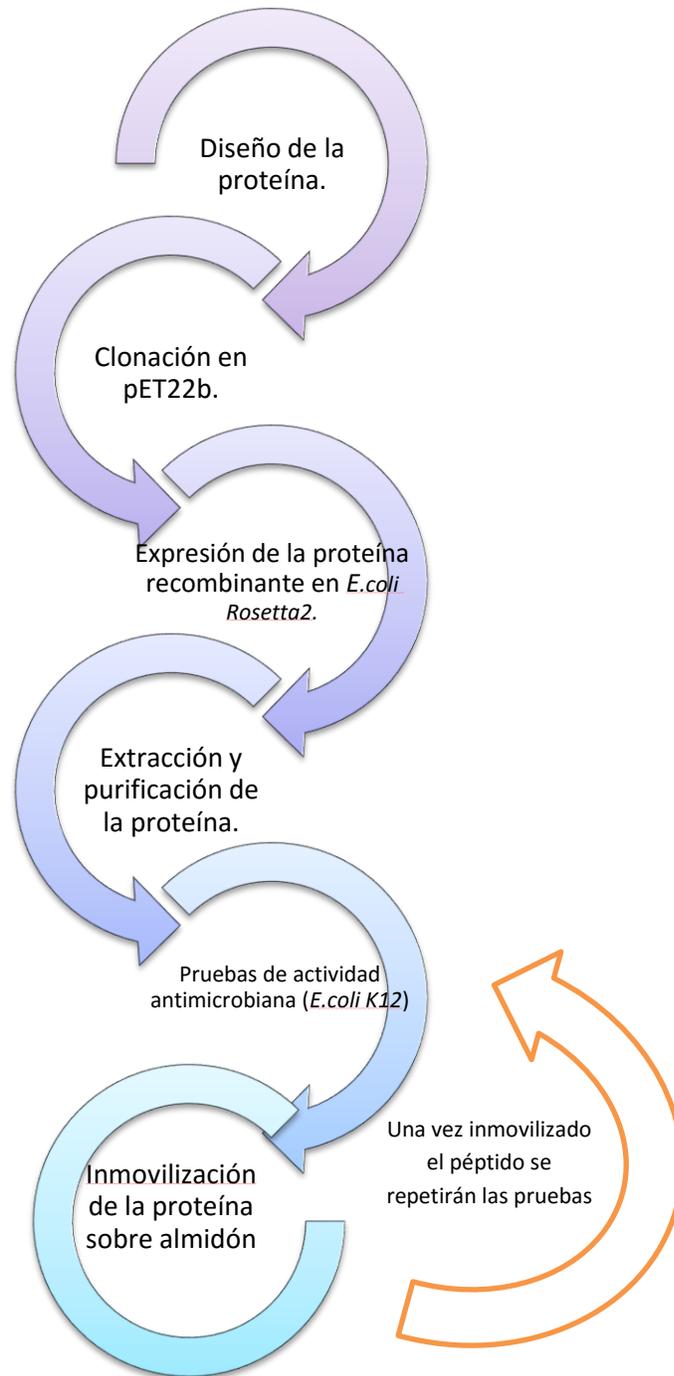


Diagrama 1. Estrategia experimental para el desarrollo del proyecto propuesto

6.2 Construcción de la proteína recombinante DFA-LL37

El DFA_{tag} (patente MX/a/2012/005765) se obtuvo por amplificación a partir del plásmido pQE31-DFA_{tag}. Para ello se diseñaron 2 primers reverse, que además de amplificar el DFA añadían un sitio de restricción para la enzima *EcoRI*. El primer forward utilizado es específico para el vector (pQE31 type III/IV). En la Tabla 1 se muestran las secuencias.

Primer	Secuencia
Eco1 (reverse)	GTATCGGCTTAC GAATTC CCTTG
Eco2 (reverse)	GAATTC CTTGATGTGCTG
pQE31 type III/IV (forward)	CGGATAACAATTTACACAG

Tabla 1. Primers utilizados para la amplificación del DFA a partir del vector pQE31. En negritas se encuentra resaltado el sitio de corte *EcoRI*

El PCR se realizó con Ampli Taq (Thermo Scientific) y las condiciones utilizadas se muestran en la figura 8.

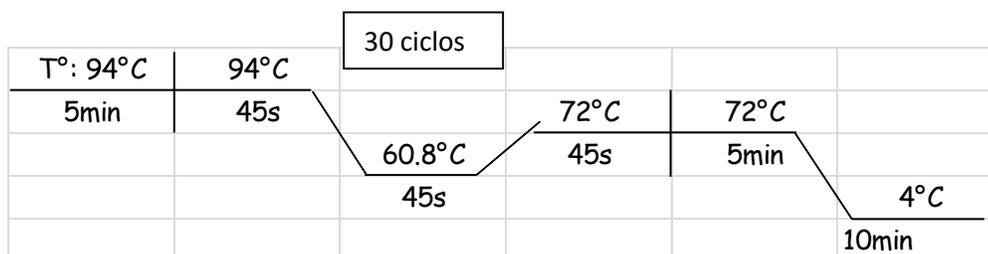


Figura 8. Esquema de condiciones y tiempo para PCR

El producto de PCR obtenido fue insertado en el vector pGEM T-easy (Figura 9) debido a que este plásmido permite ligar fragmentos provenientes de PCR flanqueados por adeninas que la *Taq* polimerasa agrega en el extremo 3' favoreciendo la ligación del producto de PCR. El fragmento se obtuvo a partir de un gel de agarosa 0.8% y se purificó por columna de vidrio. Se ligó al vector pGEM T-easy siguiendo la técnica descrita por el proveedor y se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* DH5α. Posteriormente se eligieron colonias por la selección de colonias blancas y azules (alfa-complementación) y la construcción verificada se denominó pGEM-DFA_{tag}.

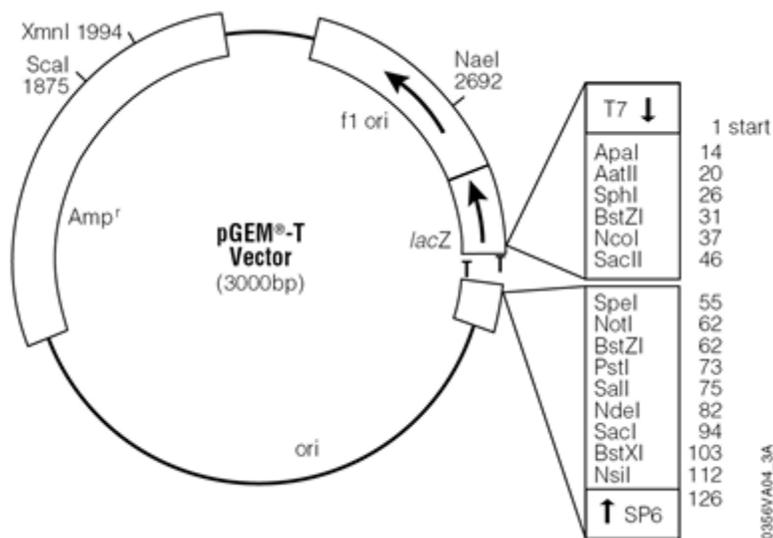


Figura 9. Mapa del vector pGEM T-easy

La segunda parte de la proteína, el péptido LL-37, fue sintetizada por GeneScript y clonado en el vector pUC57 (pUC-LL-37) (Figura 10) añadiendo una secuencia de linker hacia el extremo 5' y dos secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI* (5' y 3' respectivamente). Este plásmido fue transformado en *E. coli* DH5 α de acuerdo al protocolo de Sambrook (1989).

Posteriormente se extrajeron ambos plásmidos (pGEM-DFA_{tag} y pUC-LL37) utilizando la metodología de Sambrook por lisis alcalina. Se purificaron y se sometieron a digestión para liberar por un lado la secuencia codificante para DFA_{tag} y por otro, la secuencia correspondiente al LL37. En el caso de pGEM-DFA_{tag} se digirió primero con *BamHI* y después con *EcoRI* mientras que pUC-LL37 se digirió primero con *XhoI* y finalmente con *EcoRI*. Los fragmentos se observaron en geles de agarosa y a partir de este se purificaron en columnas de fibra de vidrio.

A

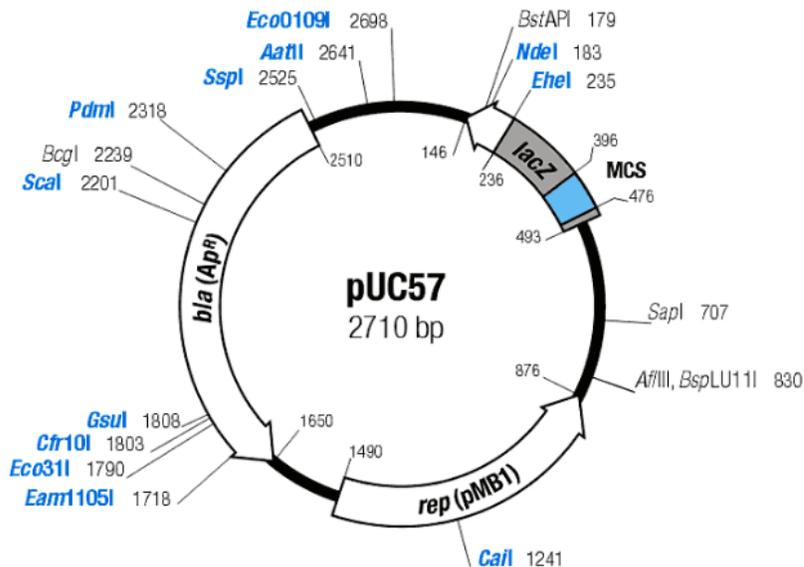


Figura 10. Vector pUC57 con la secuencia correspondiente a Linker-LL37 (LL37).

Los fragmentos puros se ligaron por separado en pET22b+ (Figura 11) con ligasa T4 de acuerdo al proveedor. Se transformó inicialmente en *E. coli* DH5 α , se seleccionaron las clonas transformantes y se extrajo el plásmido de acuerdo a Sambrook. Se confirmó la presencia de dichos fragmentos por ensayos de restricción y finalmente se transformó *E. coli* BL21 DE3 pLysS para observar su expresión en geles SDS- PAGE- y Western Blot revelado con anticuerpos anti-His.

Para la obtención de la secuencia de la proteína de fusión de interés DFA_{tag}LL37, al vector pET22b-LL37 le fue ligado con ligasa T4 el fragmento correspondiente a DFA_{tag}, haciendo una digestión previa del vector, así como del fragmento con *Bam*HI y *Eco*RI. Posteriormente se transformaron células de *E. coli* DH5 α , se seleccionaron las clonas transformantes y se extrajo el plásmido de acuerdo a Sambrook y se confirmó la presencia de dichos fragmentos por ensayos de restricción. Finalmente se transformó *E. coli* BL21 DE3 pLysS para observar su expresión en geles SDS- PAGE- y Western Blot revelando con anticuerpos anti-His y anti-1UR.

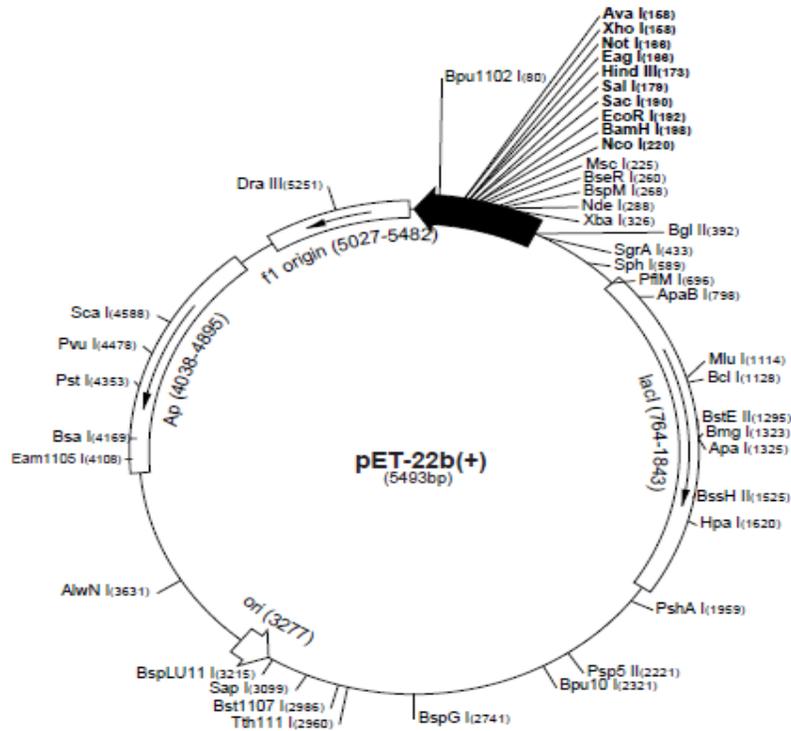


Figura 11. Vector pET22b+

6.3. Expresión en *E. coli* BL21 DE3 pLysS y purificación de LL37 y DFA_{tag}LL37

Una vez obtenidas las clonas de interés pET22b+-LL37 y pET22b+-DFA_{tag}LL37, se optimizó la producción de proteína en *E. coli* BL21 DE3 pLysS para posteriormente purificar por columna de afinidad a níquel y por almidón insoluble, respectivamente. En el caso de la proteína LL37 se induce a 0.5 de DO a 600 nm durante 4 h a 29 °C con 0.5 mM IPTG y la proteína DFA_{tag}LL37 se induce a 0.3 de DO a 600 nm durante 16 h a 29 °C con 0.1 mM IPTG.

Para la obtención de la proteína LL37 las células son lisadas por sonicación de acuerdo al apéndice VII.

6.4 Expresión en *E. coli* Rosetta 2 y purificación de LL37 y DFA_{tag}LL37

Se obtuvieron las colonias de *E. coli* Rosetta2 para los plásmidos pET22b-LL37 y pET22b-DFA_{tag}LL37 buscando optimizar la expresión de ambas proteínas. El método de extracción de éstas se lleva a cabo de manera tradicional utilizando Tritón 2% y con ayuda de sonicación (apéndice VII).

El LL37 se purificó en columna por afinidad a níquel utilizando una elución escalonada incrementando cada 10 mL 20% del buffer que contenía 250 mM de imidazol, se colectaron las fracciones desde el 80%, precipitó con TCA al 30% y resuspendió en buffer PBS pH=7.3. Se activó la proteína eliminando la etiqueta de histidinas con trombina (GE Healthcare 27-0846-01) (10 U/mg de LL37). Para ello se incubó a temperatura ambiente por 20 h y se purificó por columna de intercambio aniónico pH=7.8 utilizando un gradiente de NaCl 1 M para eliminar la trombina. La proteína resultante fue utilizada para los ensayos de actividad antimicrobiana.

En el caso del DFA_{tag}LL37 se purificó por almidón crudo utilizando 300 mg por cada litro de medio de cultivo. Se incubó durante 2 h con agitación moderada a 4 °C, se centrifugó y eliminó el sobrenadante; el pellet de almidón con la proteína adsorbida se lavó con buffer citratos-fosfatos pH=5.5 y eluyó con β -ciclodextrina 9 mg/mL en un buffer PBS pH=7.3 (óptimo para la trombina). Posteriormente se eliminó la etiqueta de histidinas con trombina (Sigma-Aldrich T1063) (5 U/mg de proteína) y resina níquelada (1 mL/mg) de proteína para exponer la etiqueta, permitiendo la acción de la enzima incubando por 16 h a temperatura ambiente con agitación moderada. Finalmente se centrifugó para eliminar la resina y en el sobrenadante se encontró la proteína sin tallo.

6.5 Pruebas de actividad antimicrobiana contra *E. coli* K12

Las pruebas de actividad antimicrobiana se realizaron utilizando el LL37 en solución con y sin etiqueta de histidinas y el DFA_{tag}LL37 en solución (libre) y adsorbido en almidón (DFA_{tag}LL37+almidón). Para el LL37 se utilizaron 36 μ g/mL, 144 μ g/mL y 250 μ g/mL de proteína, para el DFA_{tag}LL37 se utilizaron 36 μ g/mL, 144 μ g/mL de LL37 (Ver tabla 4 anexo II) y para el DFA_{tag}LL37

se utilizó el máximo adsorbido en 100 mg y 200 mg de almidón. La adsorción se llevó a cabo de la misma manera que la purificación (apéndice IX).

El inóculo inicial de *E. coli* K12 se agregó cuando este se encontraba en fase exponencial al mismo tiempo que las proteínas. Se incubaron por 16 h a 37 °C con agitación suficiente para evitar que el almidón se apelmazara en el fondo del tubo y se diluyeron para plaquear en caja. Después de la incubación en líquido se realizó un conteo visual de colonias totales por placa por triplicado, asegurándonos que cada caja tuviera entre 30 y 300 colonias; para ello se plaquearon 10 µL de las diluciones 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} . Tomando el control positivo (*E. coli* K12 sin proteína) como referencia, se calculó el porcentaje de inhibición utilizando la regla de las proporciones para cada concentración de LL37 probada.

7. Resultados y discusión

7.1 Diseño de la proteína recombinante DFA_{tag}LL37

Para obtener la proteína recombinante se construyó una fusión del DFA_{tag} (patente MX/a/2012/005765) con el péptido antimicrobiano LL-37. Estas dos proteínas flanquean un brazo (linker) para ayudar a separar al LL-37, que es muy pequeño, del DFA_{tag}. La fusión se diseñó según se muestra en la figura 12.

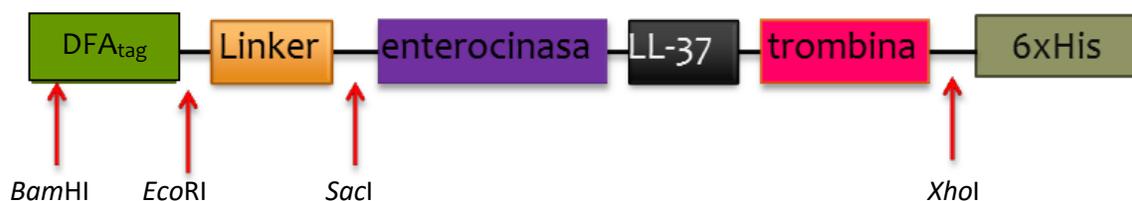


Figura 12. Diseño de la proteína recombinante DFA_{tag}LL37 (la figura no está realizada a escala).

En la figura 12 se ilustran los 2 sitios de corte para proteasas que se incluyeron adyacentes al linker (naranja), esto es para poder liberar por un lado al LL37 (negro) del DFA_{tag} (patente MX/a/2012/005765) (verde) y por otro eliminar el tallo de histidinas. Este tallo proviene del vector en el que se expresó y se aprovechó para bloquear temporalmente el extremo carboxilo terminal y así evitar la posible actividad antimicrobiana del péptido dentro de la bacteria. En la construcción del gen que codifica a esta proteína se incluyeron 4 sitios de restricción distintos (*Bam*HI, *Eco*RI, *Sac*I, *Xho*I) para facilitar su clonación y/o posible modificación.

En la figura 13 se muestra en naranja la secuencia de aminoácidos correspondiente al linker, en negro el LL37 y motivos proteasas morado y rojo para enterocinasas y trombina, respectivamente. El linker fue diseñado a partir de uno presente entre el dominio catalítico y el DFA de una glucoamilasa de *Rhizopus oryzae* (Shu-Chuan *et al.*, 2007). El péptido antimicrobiano fue modificado en el extremo carboxilo (secuencia original en la Figura 1) al eliminar 2 aminoácidos, treonina y ácido

glutámico, y en su lugar se colocó una glicina. Estas modificaciones generan el motivo de aminoácidos que reconoce la trombina dentro del péptido evitando agregar aminoácidos que pudieran interferir en la activación del péptido y por tanto afectando su actividad antimicrobiana. Cabe mencionar que no se espera que esta modificación afecte la actividad ya que la secuencia mínima reportada con actividad no fue modificada (dominio α -hélice C-terminal, Figura 1).



Figura 13. Secuencia de aminoácidos para el linker, LL-37 y motivos proteasa. Recuadro naranja: linker, letras moradas: motivo proteasa (enterocinasa), recuadro negro: péptido LL-37 con motivo proteasa (trombina) en letras rojas (LVPRGS).

El vector pET22b+ fue utilizado para la expresión de las proteínas recombinantes LL37 y DFA_{tag}LL37 a partir de las secuencias que tenemos en pUC57 (LL37) y pQE31 (DFA_{tag}). pET22b+ fue elegido debido a que el sistema de expresión permite una alta regulación, además del péptido señal que debería permitir una extracción adecuada de la proteína.

7.2 Clonación y expresión del DFA_{tag} (patente MX/a/2012/005765) en pET22b+

Para la obtención del DFA_{tag} (patente MX/a/2012/005765) con los elementos necesarios para su clonación este fue amplificado y al mismo tiempo se agregaron los sitios de restricción (*Eco*RI y *Bam*HI, Tabla 1) para su inserción en pET22b+ y para la fusión al péptido en el extremo carboxilo. Esta construcción permite dejar expuesto el C-terminal del AMP y por tanto disponible para poder interactuar con la membrana bacteriana blanco.

Como una primera aproximación se realizó una amplificación en gradiente para probar los dos primers “reverse” y optimizar la temperatura de amplificación para cada uno de ellos. En la figura 14 se observan los amplificadores obtenidos, en todos ellos encontramos amplificación de las

unidades repetidas que conforman el DFA_{tag} (patente MX/a/2012/005765). Se eligieron aquellas condiciones donde el producto de 1500 pb fuera el más abundante, siendo éstas a 60.8°C con el primer Eco1 y 66°C con el primer Eco2.

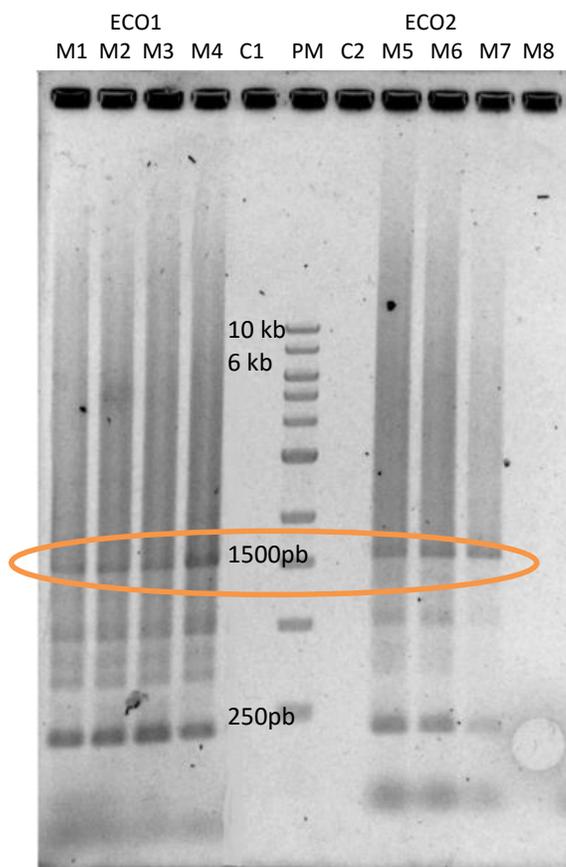


Figura 14. Productos de PCR obtenidos a partir de la amplificación de DFA_{tag} proveniente del vector pQE31-DFA_{tag}. Condiciones M1 50°C, M2 54.7°C, M3 57.3°C, M4 60.8°C, C1 57.3°C, PM 1kb ladder (fermentas), C2 62°C, M5 57.3°C, M6 59.6°C, M7 62°C, M8 66°C.

Se realizó una segunda prueba variando la cantidad de plásmido, en la que la mejor amplificación se obtuvo con los primers pQE31 type III/IV (fw) y Eco1 (rv) y con la menor concentración de plásmido pQE31-DFA_{tag} (45 ng/μl) (Figura 15 A). El fragmento de 1500pb se purificó en columna de fibra de vidrio y se clonó en el vector pGEM-T-easy (Figura 15 B). El pGEM-DFA_{tag} se transformó en células competentes *E. coli* DH5α. Las Figuras 15 C y D muestra la liberación del fragmento con digestión *EcoRI* y la linearización del vector con el sitio *BamHI*.

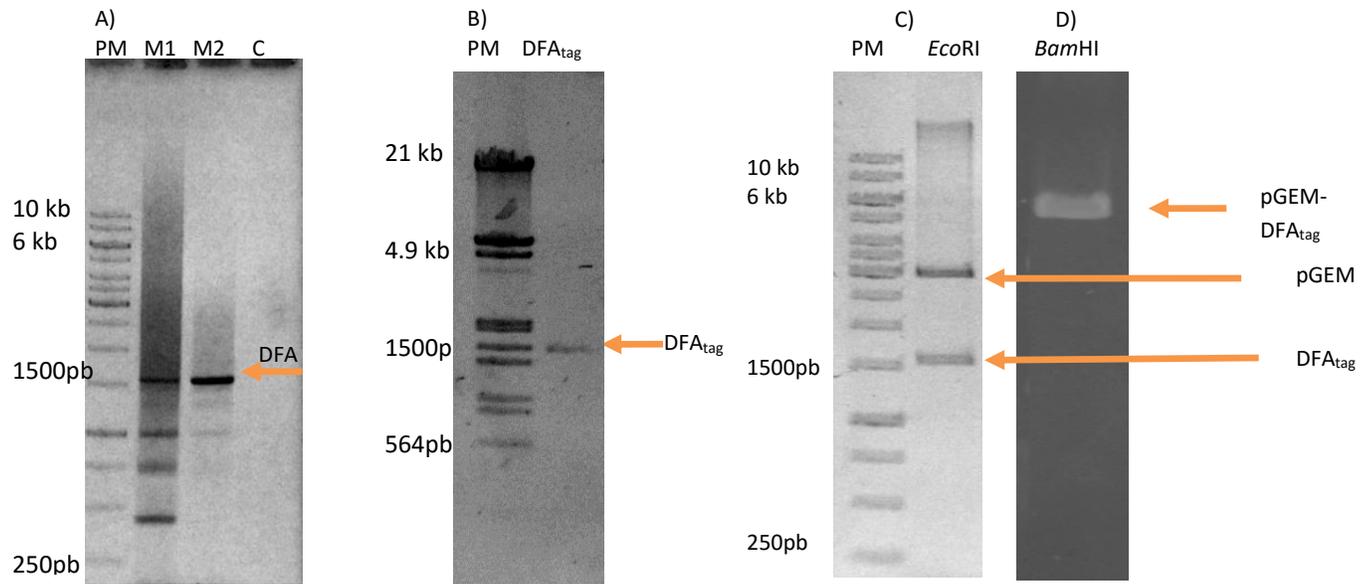


Figura 15. Fragmentos de DNA utilizados en la construcción del vector pGEM-DFA_{tag}. A) Amplificación por PCR de DFA_{tag} (patente MX/a/2012/005765) a partir de pQE31 M1- 90 ng/μl. M2- 45 ng/μl B) fragmento purificado en columna de fibra de vidrio C) construcción pGEM-DFA_{tag} digerido con *EcoRI*. D) pGEM-DFA_{tag} linearizado con *BamHI*.

El DFA_{tag} (patente MX/a/2012/005765) se subclonó en pET22b+ para la obtención de la proteína que servirá como control en la evaluación de la proteína DFA_{tag}LL37. El DFA_{tag} se obtuvo a partir del pGEM-DFA_{tag} por digestión con *BamHI* y *EcoRI*. Y se clonó en el vector pET22b+ digerido de la misma manera; ambos fragmentos se purificaron y ligaron (Figura 16). La Figura 17 muestra la obtención de la construcción pET22b+-DFA_{tag} por la liberación del fragmento DFA_{tag} del vector tras una doble digestión *EcoRI-BamHI*.

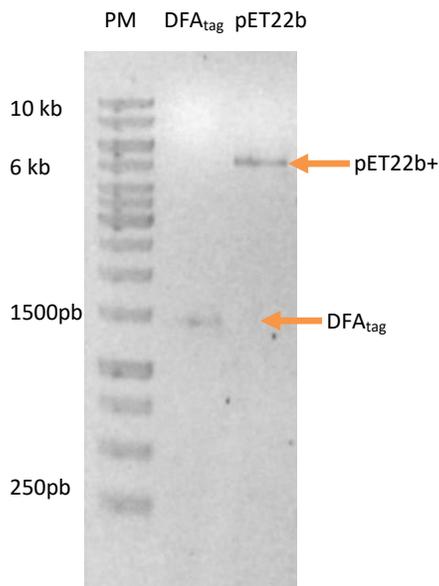


Figura 16. Digestión de los fragmentos de DNA necesarios para la construcción de vector pET22b+-DFA_{tag}. DFA_{tag} digerido *EcoRI-Bam*HI. Vector pET22b+ linearized *EcoRI-Bam*HI

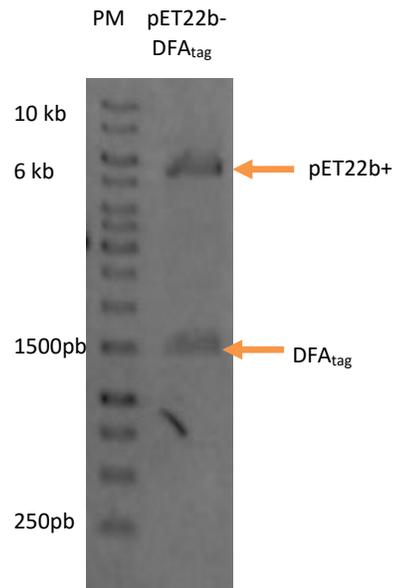


Figura 17. digestión del vector pET22b+-DFA_{tag}. *EcoRI-Bam*HI para observar la presencia del inserto DFA_{tag}.

Las células competentes de *E. coli* BL21 DE3 pLysS se transformaron con el pET22b+-DFA_{tag}. Se realizó un ensayo de expresión con IPTG 0.5 mM a 29 °C a partir de un cultivo de 12 h a 29 °C con amp y cam. La Figura 18 muestra un western blot donde se revela la expresión de la proteína con un anticuerpo anti histidina.

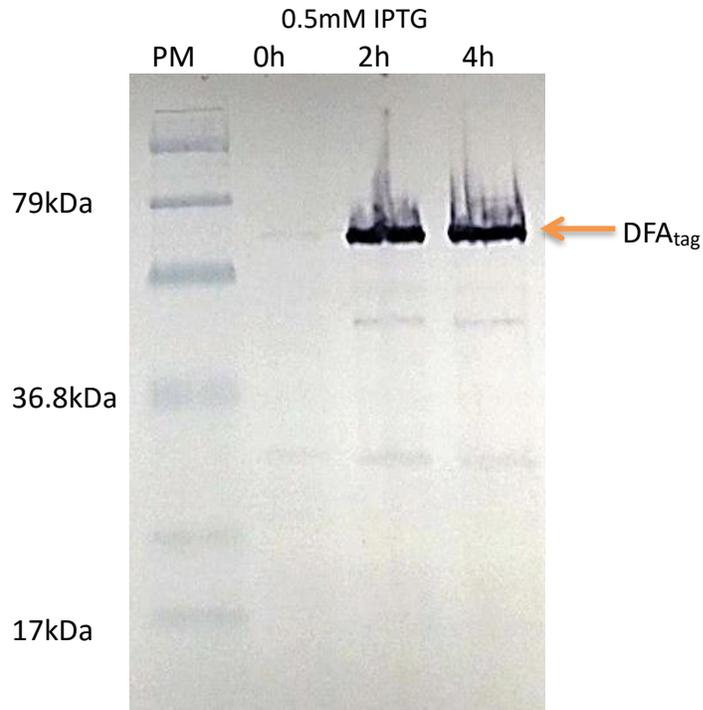


Figura 18. Expresión de la proteína DFA_{tag} (patente MX/a/2012/005765) mostrada por Western Blot anti His. Cinética de producción incluyendo en el cultivo amp y cam. PM) Prestained SDS-PAGE Broad Range (Biorad). 0, 2 y 4 h de inducción con 0.5 mM IPTG

7.3. Subclonación y expresión de LL37-His en pET22b+

Con el objetivo de poder expresar la proteína LL37 en *E. coli* se realizó una subclonación del péptido LL37-His a partir de pUC57-LL37. El fragmento se obtuvo por digestión enzimática con *EcoRI* y *XhoI*. Por otro lado, el vector pET22b+ se digirió de la misma manera y ambos fragmentos se purificaron (Figura 19A). En la figura 19B se muestra la digestión del vector pET22b+-LL37 *EcoRI-XhoI* para liberar la secuencia correspondiente al péptido.

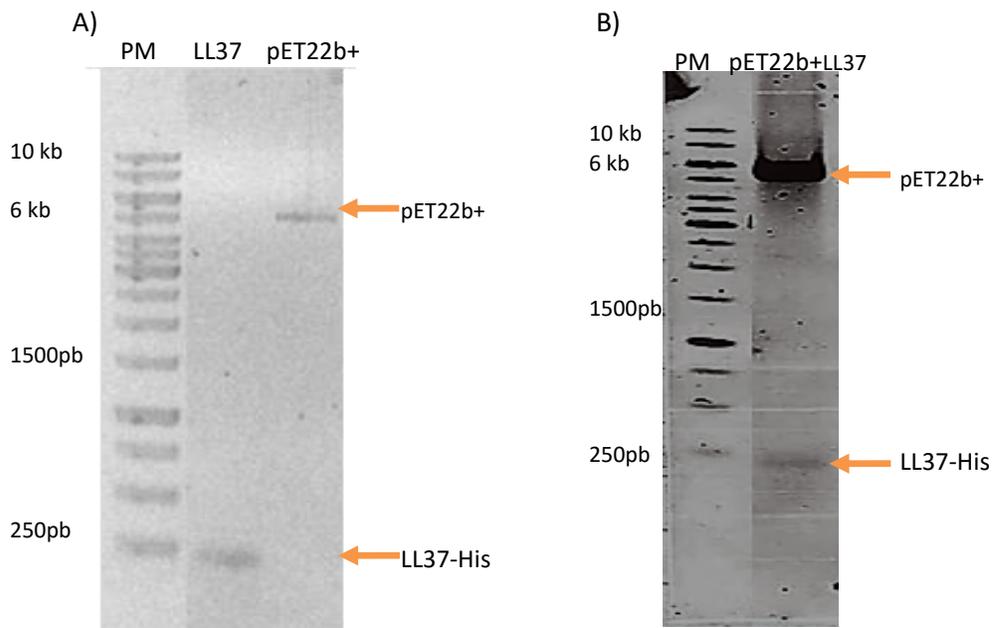


Figura 19. Digestión de fragmentos de DNA para la obtención del vector pET22b+-LL37 (A) y confirmación de la inserción del inserto LL37 (B). A) LL37 digerido *EcoRI-XhoI* y Vector pET22b+ linearizado *EcoRI-XhoI*. B) Vector pET22b+-LL37 digerido *EcoRI-XhoI*

La expresión de la proteína LL37-His se probó en dos cepas de *E. coli* (*BL21 DE3 pLysS* y *Rosetta 2*). La Figura 20 muestra la expresión en *E. coli* BL21 DE3 pLysS inducido a las 12 h a 29 °C. La inducción con IPTG 0.5 mM fue monitoreada a las 0, 2 y 4 h y observada por Western Blot revelado con anti-His.

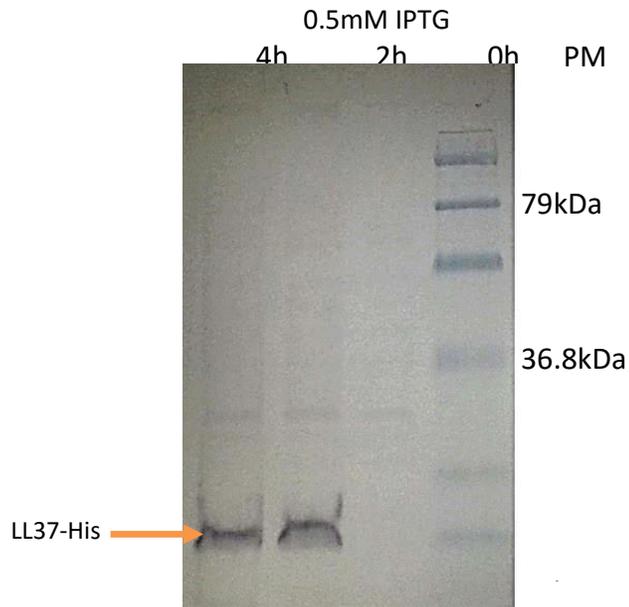


Figura 20. Expresión de la proteína LL37 por Western blot anti). Cinética de producción incluyendo en el cultivo amp y cam.PM) Prestained SDS-PAGE Broad Range (Biorad). 0, 2 y 4 h de inducción con 0.5 mM de IPTG

La Figura 21 muestra un Western blot donde se observa la expresión de la proteína en *E. coli* Rosetta2 en un cultivo inducido durante 4 h después de 12 h de crecimiento a 29 °C.

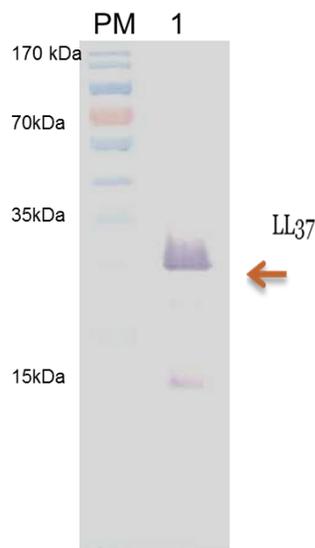


Figura 21. Expresión de la proteína LL37-His a 29 °C. Inducción con 0.1 mM IPTG por 4 h. Carril 1.- colonia de *E. coli* Rosetta 2 con el plásmido pET22b-LL37. PM. - prestained protein ladder fermentas.

Aún y cuando el peso esperado es de 15 kDa la mayor parte de la proteína se observa a 30 kDa, justo el doble de su peso, lo que sugiere que la proteína dimeriza. La formación de dímeros no es extraña ya que, de acuerdo al mecanismo de acción reportado por Hancock y Chapple (1999), estos péptidos pueden oligomerizar para la formación de poros en la membrana bacteriana.

7.4. Efecto de la producción de la proteína LL37-His en el crecimiento celular

Dado que el LL37 es un péptido antimicrobiano se realizaron curvas de crecimiento (por triplicado) para ambas. El crecimiento se monitoreó durante 32 h. En la Figura 22 A y B se muestran las gráficas donde se observa una velocidad de crecimiento para la cepa BL21 DE3 pLysS sin inducción y con inducción de 0.39 h^{-1} y 0.36 h^{-1} . Para la cepa Rosetta 2 sin inducir e inducida las velocidades de crecimiento fueron de 0.38 h^{-1} y 0.39 h^{-1} respectivamente lo que sugiere que la producción del LL37-His no provoca abatimiento del crecimiento de la bacteria en ninguna de las cepas indicando que la actividad del péptido está siendo bloqueada como se esperaba por las 6 histidinas añadidas.

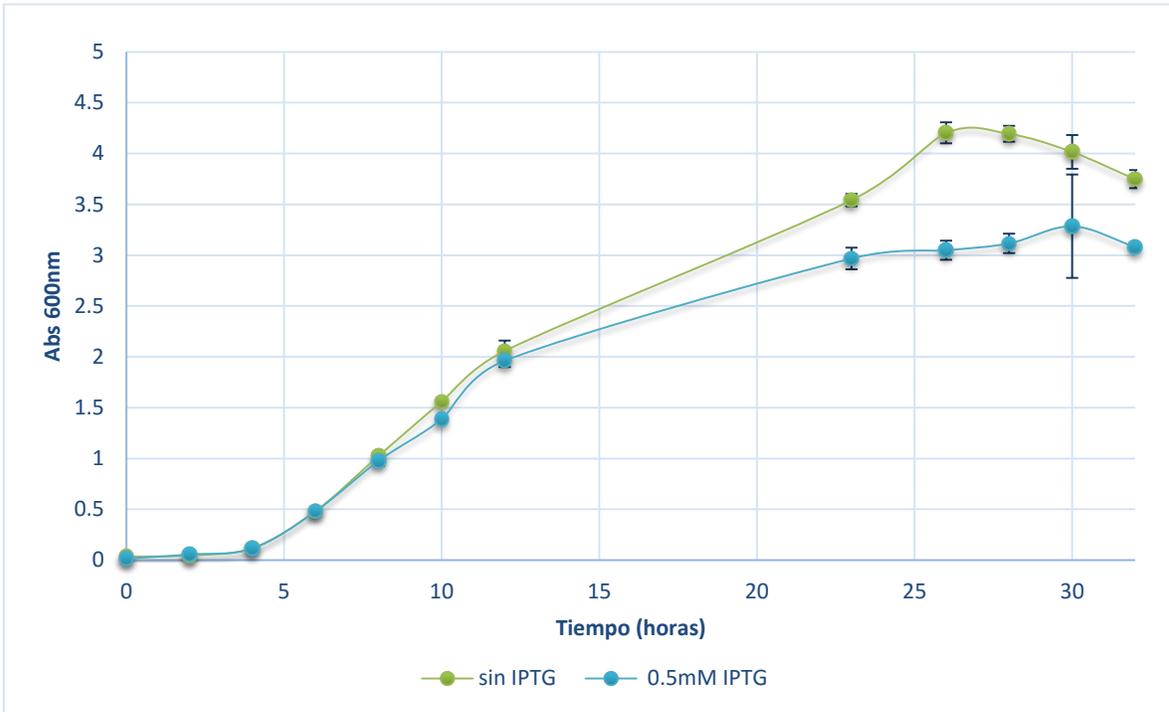


Figura 22A. Curva de crecimiento para *E. coli* BL21 DE3 pLysS y *E. coli* BL21 DE3 pLysS pET-LL37 inducido y sin inducir.

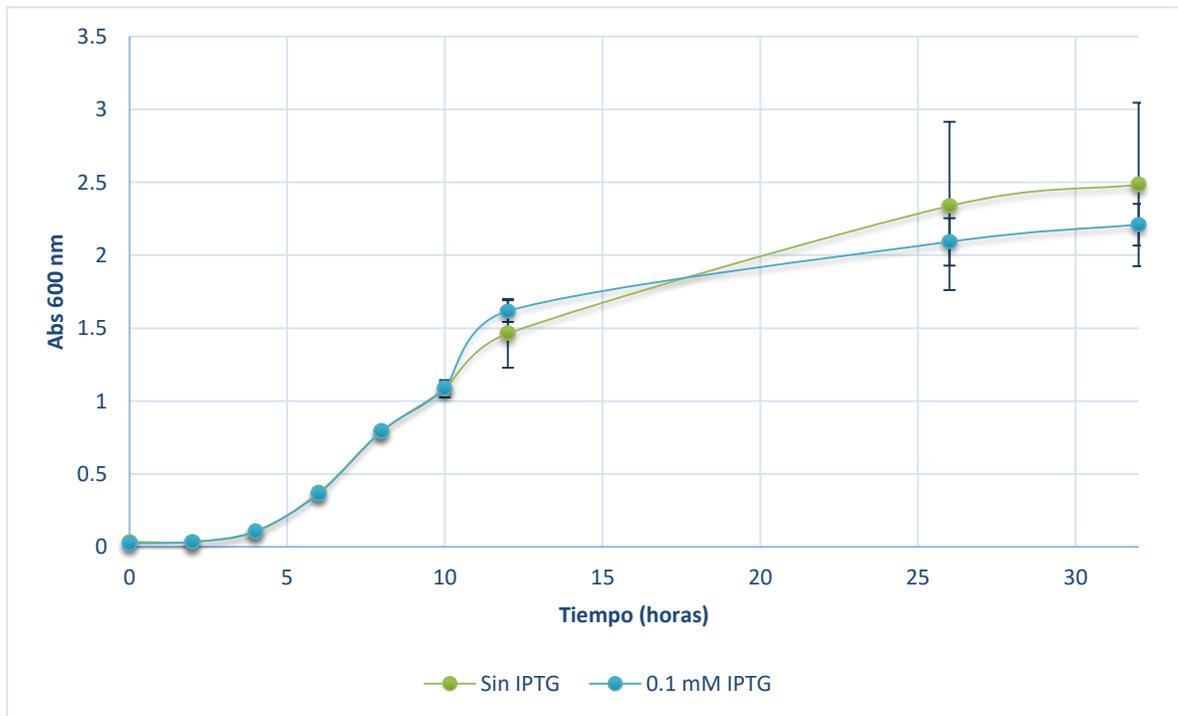


Figura 22B. Curva de crecimiento *E. coli* Rosetta 2 pET22b+-LL37 a 29°C. Inducción con 0.1mM IPTG a las 6 horas de crecimiento.

7.5 Purificación de la proteína LL37-His por afinidad a níquel

El péptido LL37-His no es detectable a 280 nm debido a su bajo contenido de aminoácidos aromáticos, por lo que el análisis de elución de la columna se realizó en SDS-PAGE. La proteína LL37-His eluyó de la columna de Níquel cuando se emplearon entre 200 mM y 250 mM de imidazol. La concentración final de la proteína LL37 pura obtenida a partir de la cepa BL21 fue de 60 µg/L de medio de cultivo. En el caso de la misma proteína expresada en Rosetta 2 se obtuvo un rendimiento de 2.5 mg/L de medio de cultivo. La concentración mínima inhibitoria del péptido LL-37 reportada se encuentra alrededor de los 180 µg/mL (Vandamme, et al., 2012) por lo que a partir de este punto en adelante toda la proteína LL37-His obtenida para este trabajo se obtuvo de *E. coli* Rosetta 2.

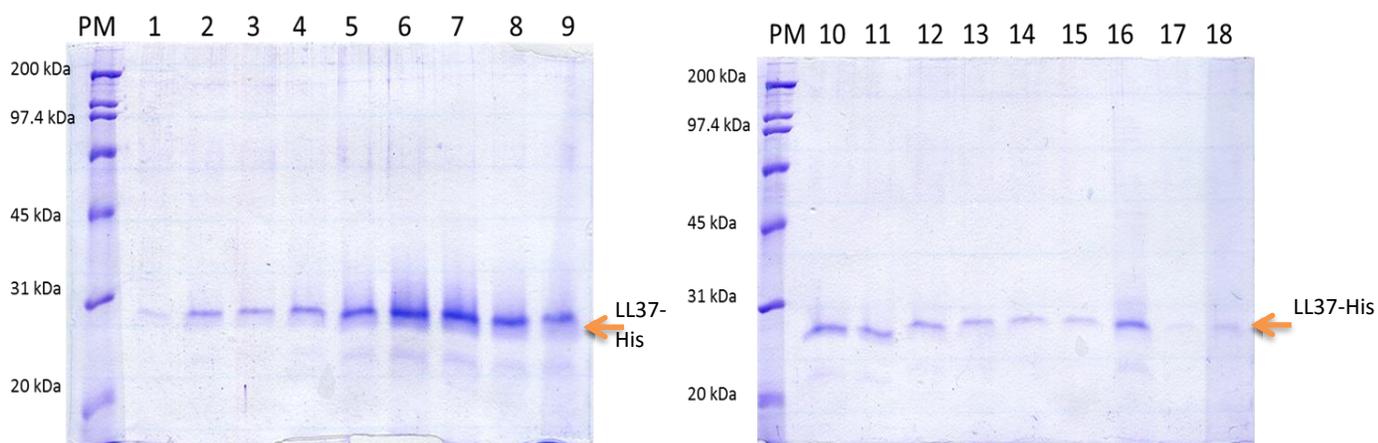


Figura 23 Proteína obtenida de la purificación por afinidad a níquel. Carriles 1-18.- fracciones eluidas con 250mM de imidazol. PM. -Broad Range ladder BioRad

7.6 Eliminación de la etiqueta de histidinas del LL37-His

La proteína debe ser activada (eliminar la etiqueta de histidinas) para poder realizar las pruebas de actividad antimicrobiana, para lo cual se requiere de proteasas. De acuerdo con el fabricante (GE Healthcare) por cada mg de proteína son necesarias 10 unidades de trombina, utilizando esta

relación la etiqueta no se eliminaba completamente (Figura 24) por lo que después purificarla por una columna de intercambio aniónico, para eliminar la trombina, la proteína LL37 se unió a resina níquelada; de esta forma se purificó la proteína activa (Figura 25).

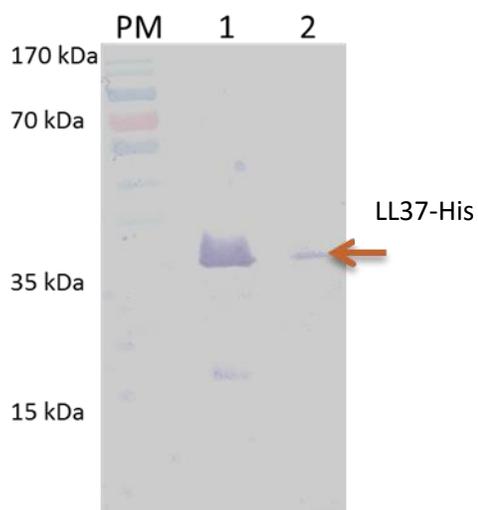


Figura 24. Eliminación del tallo de histidinas con trombina (1U/100µg de proteína). Carriles 1.- proteína sin trombina. 2.- Proteína después de la incubación. PM.- Broad Range BioRad

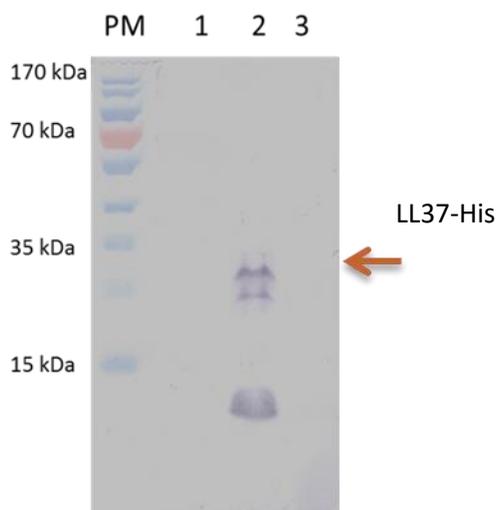


Figura 25. Proteína obtenida después de la unión a la resina níquelada. Carriles 1-3 fracciones obtenidas en el proceso. 1 y 3 proteína sin histidinas. PM.- Broad Range BioRad

7.7. Construcción y expresión de la proteína DFA_{tag} + LL37-His

Con el objetivo de obtener la proteína recombinante DFA_{tag}LL37-His se realizaron una serie de pasos que incluyeron la utilización del fragmento de DNA del DFA_{tag} liberado a partir del vector pET22b+-DFA_{tag} por digestión *Bam*HI y *Eco*RI. Este se ligó en el vector pET22b+-LL37 previamente digerido *Bam*HI y *Eco*RI (Figura 26 A). La ligación se transformó en células de *E. coli* DH5α (Figura 26 B). La construcción se verificó por restricción y secuenciación y se transformó en *E. coli* BL21 DE3 pLysS (Figura 26 C).

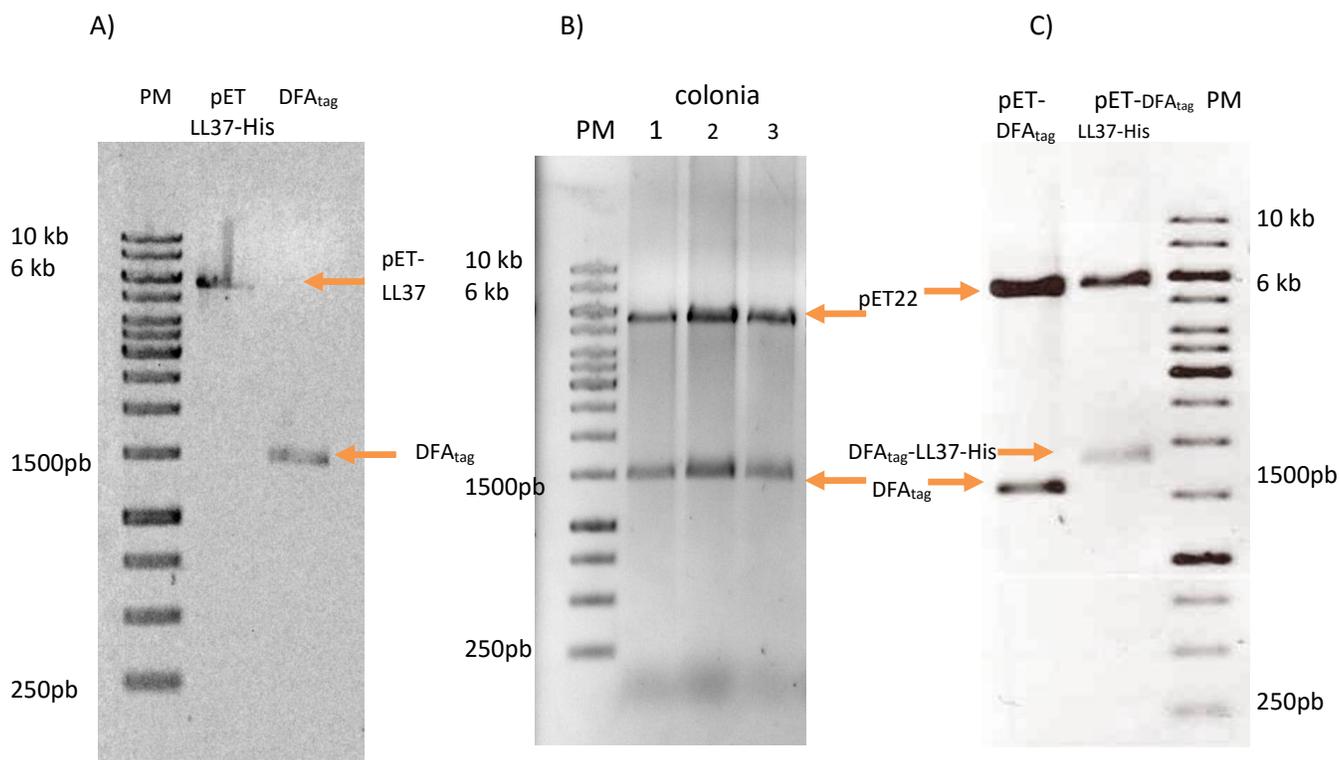


Figura 26. Fragmentos de DNA obtenidos para la construcción del vector pET-DFA_{tag}LL37. A) productos puros para la ligación y obtención de la proteína DFA_{tag}LL37-His. B) Digestión *Bam*HI- *Eco*RI para liberar DFA_{tag}. C) pET-DFA_{tag} digerido *Bam*HI- *Xho*I para liberar DFA_{tag}, pET-DFA_{tag}LL37 digerido *Bam*HI-*Xho*I para liberar DFA_{tag}LL37. Marcador de peso molecular, en todos los casos, 1kb ladder fermentas.

En los primeros ensayos de expresión no se observó la proteína DFA_{tag}LL37-His por Wester blot anti His. Dado que la secuencia era correcta y se encontraba en marco de lectura, se realizó un segundo intento para observar la expresión de la proteína. Se eligieron colonias al azar de *E. coli* BL21 DE3 pLysS/ DFA_{tag}LL37-His, se incubaron 12 h a 29 °C utilizando ambos marcadores de selección (amp y cam). La expresión se indujo con IPTG 0.1 mM por 4 h. La identificación de la proteína se realizó por Western Blot y en esta ocasión se realizó el revelado tanto con el anti-His como con un anticuerpo policlonal que reconoce el DFA_{tag}. En la Figura 27 B se observa la expresión de la proteína DFA_{tag}LL37-His en la membrana revelada con anti-1DFA_{tag} no así con el anti-His (Figura 27 A), lo que sugiere que la proteína si se expresó, sin embargo, la etiqueta de histidinas no se encuentra disponible para el reconocimiento por el anticuerpo razón por la cual no había podido ser observada la proteína anteriormente. A partir de estos resultados se eligió la colonia 4 ya que aparentemente presenta mayor expresión para optimizar la misma.

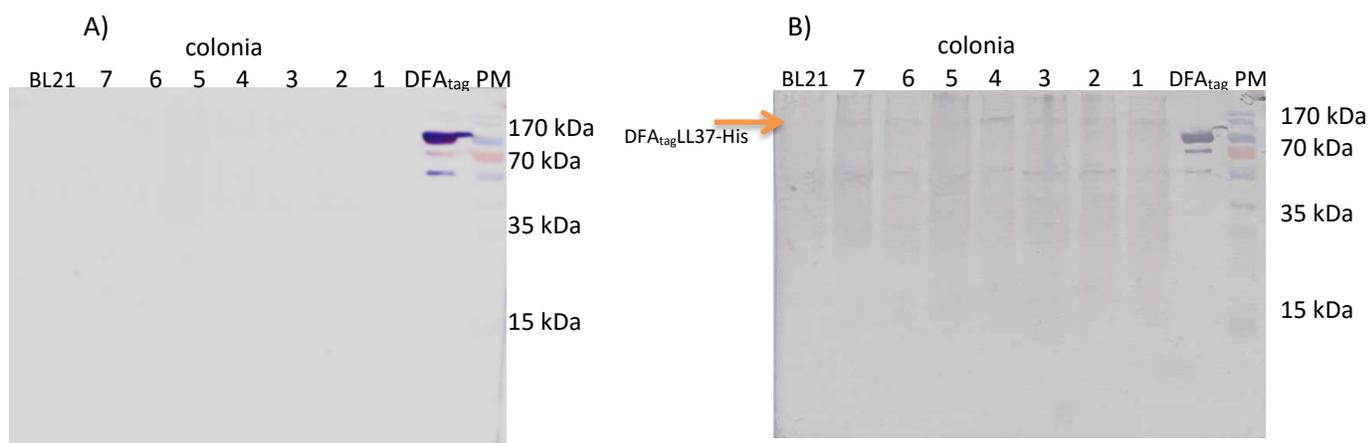


Figura 27. Expresión de la proteína DFA_{tag}LL37-His de 7 colonias que contienen el plásmido pET22-DFA_{tag}LL37-His inducidas con 0.1mM IPTG por 4 horas a 29°C. A) anti his, B) anti 1UR. PM prestained de BioRad

Se probaron diferentes tiempos y temperaturas de inducción, de 4 a 16 h y 20 °C, 29 °C, 37 °C, respectivamente, así como presencia/ausencia de cam. Se evaluó la expresión por Western Blot anti His y anti DFA_{tag}. Como se muestra en la Figura 28 A y B al revelar contra el DFA_{tag} la proteína se observa en todas las condiciones, pero dado que el interés era tener expuesto el tallo de histidinas para su posterior eliminación y de acuerdo con la imagen 28 A donde se observa claramente la

banda deseada a 29 °C, sin cam, y 16 h de inducción con 0.1 mM IPTG, se establecieron las anteriores condiciones como las mejores para la expresión de la proteína DFA_{tag}LL37-His en *E. coli* BL21 DE3 pLysS: Este resultado sugiere que durante el plegamiento la etiqueta de histidinas se oculta en la parte hidrofóbica de la proteína, enmascarándola.

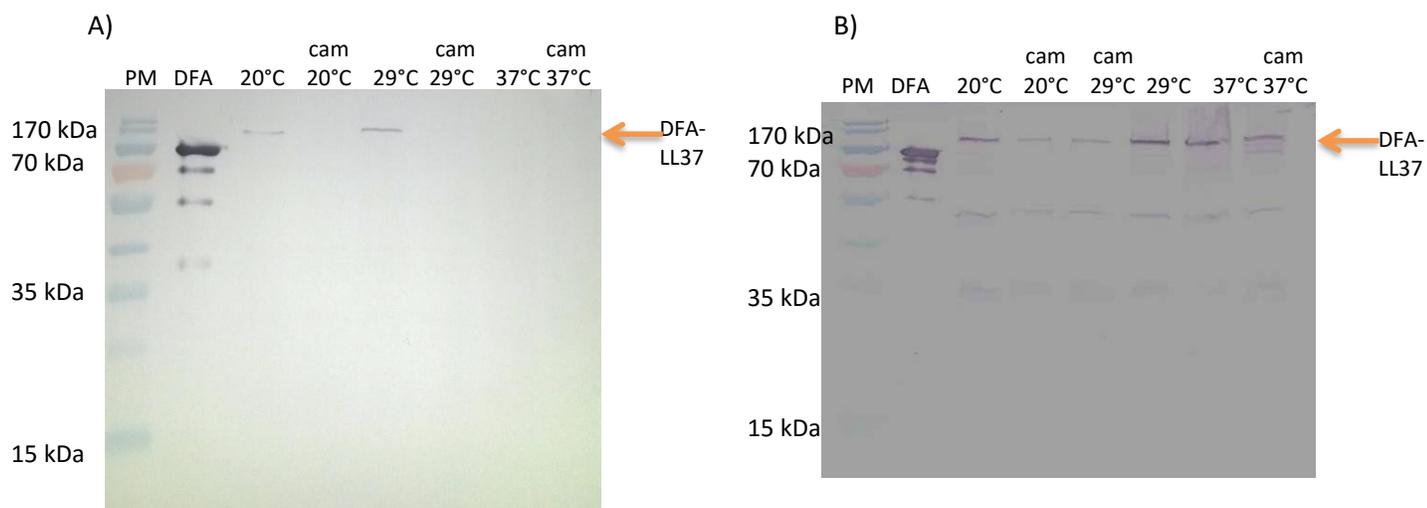


Figura 28. Expresión de la proteína DFA_{tag}LL37-His s de la colonia 4 a 20 °C, 29 °C y 37 °C con y sin cam después de 16 h de inducción con 0.1 mM IPTG. A) anti his, B) anti 1UR

Desafortunadamente, como se observa en la Figura 29 la proteína se encuentra en la fracción insoluble del lisado, sugiriendo que la proteína podría estar embebida en la membrana dada su naturaleza o, en su defecto, de manera insoluble. Se optó entonces por probar la expresión de la proteína en *E. coli* Rosetta 2.

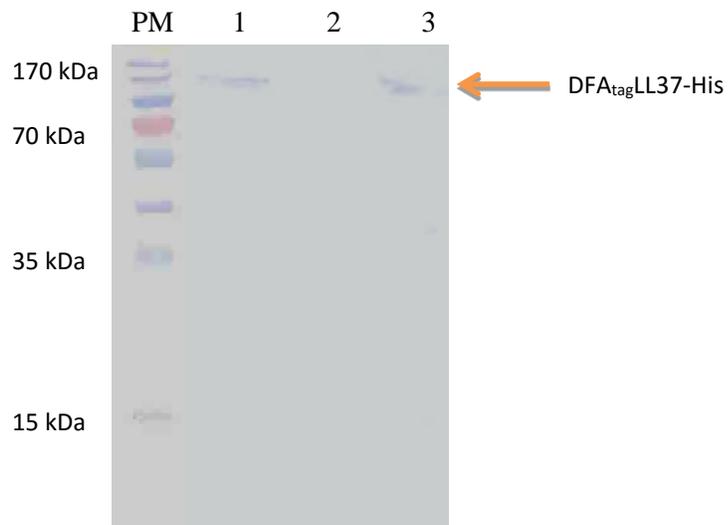


Figura 29 Expresión de la proteína DFA_{tag}LL37-His. 1) Pellet bacteriano *E. coli* BL21 pET22b-DFA_{tag}LL37, 2) fracción soluble del lisado celular 3) fracción insoluble después de la sonicación. PM prestained MWM (Fermentas).

Tras la transformación del vector pET22b-DFA_{tag}LL37 a *E. coli* Rosetta2 se confirmó la mejora de la expresión de la proteína por medio de un Western blot anti-His (Figura30). Para esta prueba se eligieron 9 colonias transformantes que después de una incubación overnight se indujeron con IPTG 0.4 mM por 6 h a 29 °C.

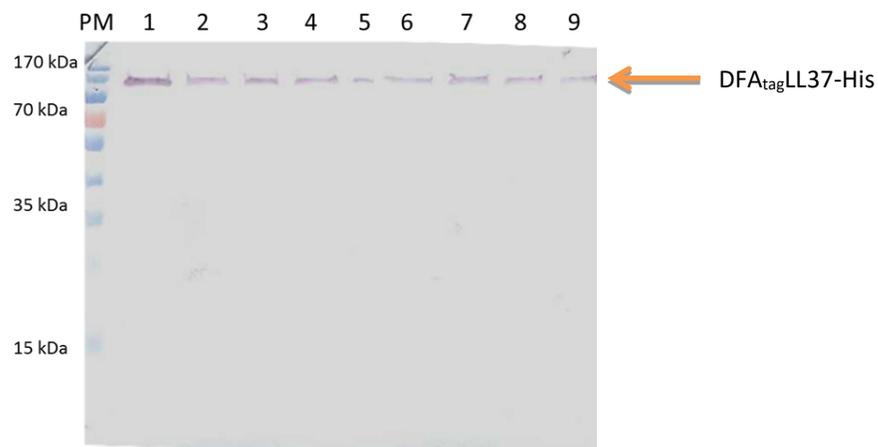


Figura 30. Expresión de la proteína DFA_{tag}LL37-His en Rosetta 2. Inducción con 0.5 mM IPTG. Carriles 1-9.- colonias de *E. coli* Rosetta 2 con el plásmido pET22b-DFA_{tag}LL37. PM. - prestained protein ladder (Fermentas).

Confirmada la expresión del DFA_{tag}LL37-His se realizó una fermentación con la transformante 1, utilizando medio LB con y sin glicerol 1% para posteriormente realizar la extracción y purificación sobre almidón, aprovechando la capacidad de adsorción propia del DFA_{tag}. La extracción se realizó por sonicación utilizando diferentes detergentes (Tritón 2%, SDS 2% y Sarkosyl 2%). Después de la extracción se agregaron 100 mg de almidón a los lisados. En la figura 31 observamos 3 geles cada uno correspondiente a los diferentes detergentes utilizados, así como los distintos medios con y sin glicerol a dos temperaturas de crecimiento. Después de la extracción la proteína mantiene su capacidad de unión al almidón y se extrae y purifica en mayor cantidad al utilizar Tritón (Figura 31 A) seguido de aquella con Sarkosyl (Figura 31 C) y finalmente con SDS donde la poca cantidad que se adsorbió al almidón se encuentra degradada (Figura 31 B). Finalmente se determinó que se puede utilizar un medio sin glicerol con 4 h de inducción a 29 °C utilizando 0.1 mM IPTG y Tritón 2% como detergente para la lisis celular.

Hasta este punto la cepa Rosetta 2 presenta muchas ventajas con respecto a BL21: no solo produce la proteína DFA_{tag}LL37-His aparentemente en mayor concentración, sino que está de manera soluble y necesita una cuarta parte del tiempo de inducción. Es importante mencionar que las ventajas de expresión obtenidas con la cepa Rosetta 2 están determinadas por los codones extras que contiene la cepa lo que permite que se expresen proteínas raras heterólogas eficientemente.

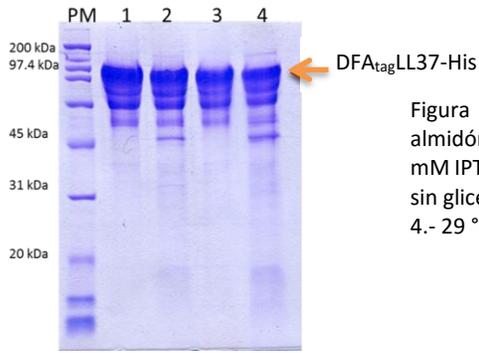


Figura 31 A. Proteína. DFA_{tag}LL37-His purificada con almidón utilizando tritón al 2% en la lisis. Inducción 0.1 mM IPTG por 4 h. Condiciones de crecimiento: 1.- 20 °C sin glicerol. 2.- 20 °C con glicerol 1%. 3.- 29 °C sin glicerol. 4.- 29 °C con glicerol 1%. PM. - Broad Range BioRad

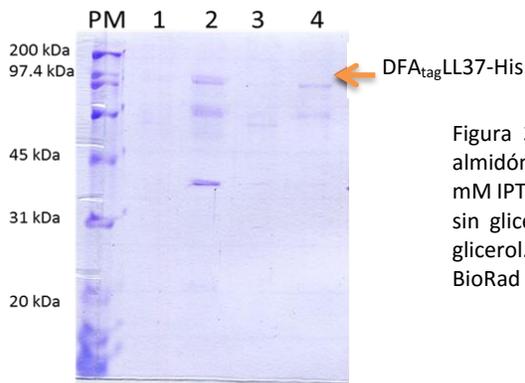


Figura 31 B. Proteína DFA_{tag}LL37-His purificada con almidón utilizando SDS al 2% en la lisis. Inducción 0.1 mM IPTG por 4 h. Condiciones de crecimiento 1.- 20 °C sin glicerol. 2.- 20 °C con glicerol 1%. 3.- 29 °C sin glicerol. 4.- 29 °C con glicerol 1%. PM. - Broad Range BioRad

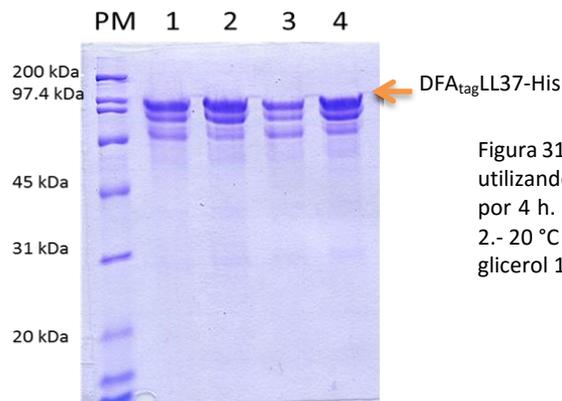


Figura 31 C. Proteína DFA_{tag}LL37-His purificada con almidón utilizando Sarkosyl al 2% en la lisis. Inducción 0.1 mM IPTG por 4 h. Condiciones de crecimiento 1.- 20 °C sin glicerol. 2.- 20 °C con glicerol 1%. 3.- 29 °C sin glicerol. 4.- 29 °C con glicerol 1%. PM. - Broad Range BioRad

Por otro lado, es necesario saber si la expresión de la proteína DFA_{tag}LL37-His afectaba el crecimiento de *E. coli* Rosetta 2. Como se puede observar en la curva de crecimiento (DO a 600 nm) de la figura 32 no hay un abatimiento del crecimiento cuando se induce la expresión de la proteína a las 6 horas de crecimiento. La velocidad específica de crecimiento para *E. coli* Rosetta 2 pET22b+-

DFA_{tag}LL37 sin inducir es de 0.37 h⁻¹ e inducido de 0.36 h⁻¹, esto nuevamente confirma que la proteína se encuentra inactiva.

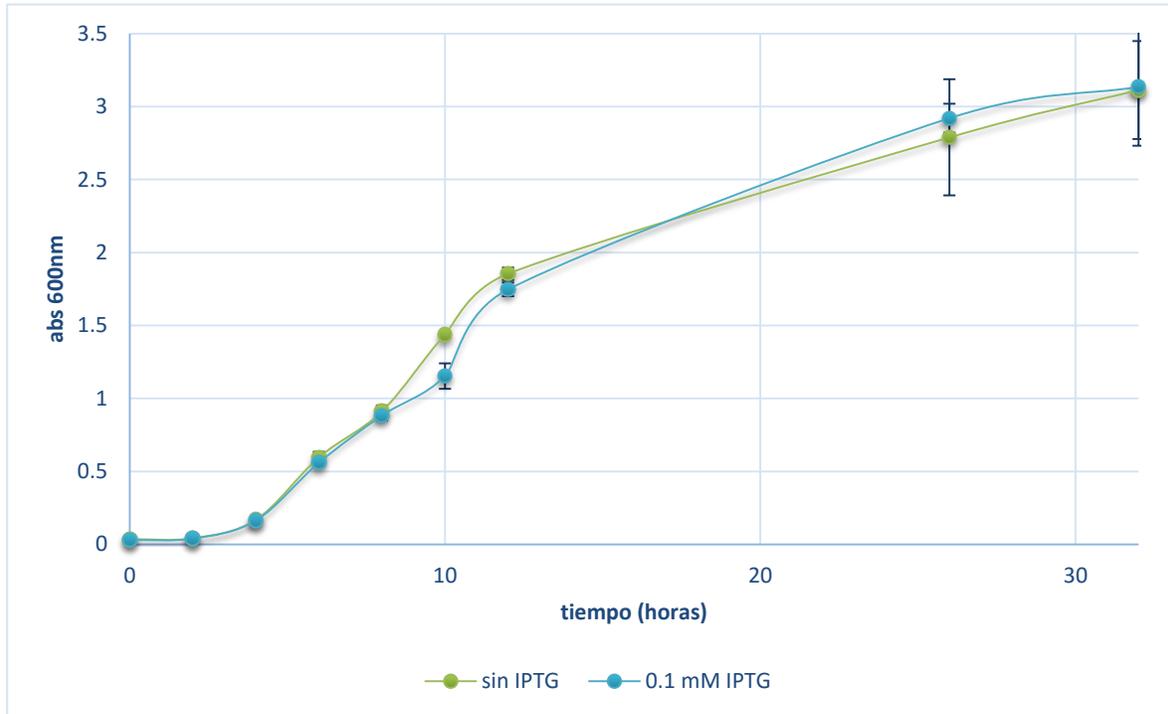


Figura 32. Curva de crecimiento *E. coli* Rosetta 2 pET22b-DFA_{tag}LL37-His a 29°C. Inducción con 0.1mM IPTG a las 6 h de crecimiento.

7.8. Eliminación de la etiqueta de histidinas del DFA_{tag}LL37-His

Para poder activar la proteína es necesario eliminar la etiqueta de histidinas que se encuentra en el extremo C-terminal y para ello, se agregó un sitio de reconocimiento de trombina. El DFA_{tag}LL37-His purificado se incubó con 1 unidad de trombina por cada 100 µg de la proteína de fusión por 16 h a temperatura ambiente. Al revelar los geles PAGE-SDS Coomassie y Western Blot anti His para conocer el estado de la proteína y si se habían eliminado las histidinas notamos dos cosas: la proteína se degradaba (Figura 33 A), lo que se puede deber a que en otras fusiones realizadas en el laboratorio

se ha observado que pH por arriba de 7, el óptimo de la trombina, desestabilizan al DFA_{tag}. El segundo resultado era que las histidinas no se eliminaban (Figura 33 B).

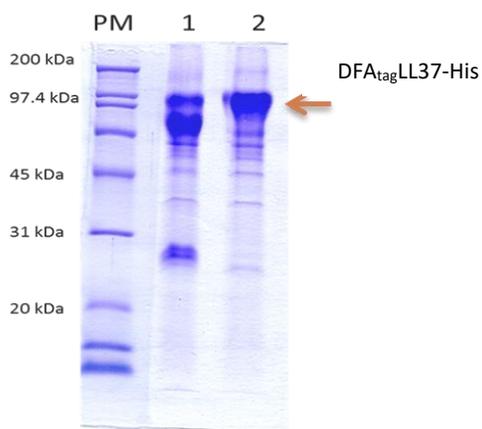


Figura 33 A. Proteína DFA_{tag}LL37-His eluida con β-ciclodextrina (9mg/mL) buffer PBS trombina pH 7.3. Carriles 1.- DFALL37 + trombina. 2.- DFALL37. PM Broad Range BioRad

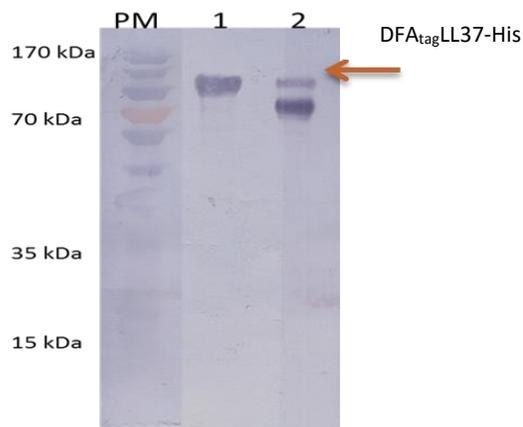


Figura 33 B. Proteína DFA_{tag}LL37-His eluida con β-ciclodextrina (9mg/mL) buffer PBS trombina pH7.3. Carriles 1. - DFALL37. 2.-DFALL37+ trombina. PM.- prestained protein ladder Fermentas

Estos resultados llevaron a dos hipótesis, 1) que la β-ciclodextrina, el eluyente de la proteína adsorbida sobre el almidón, de algún modo estuviera interfiriendo dado que el DFA_{tag} interacciona con ella y 2) que el tallo aun no estuviera lo suficientemente expuesto debido al plegamiento de la proteína y por tanto el sitio de corte no estuviera disponible para la trombina. Para probar estas dos hipótesis se decidió 1) dializar la proteína para eliminar la β-ciclodextrina y 2) agregar resina níquelada para permitir la exposición de la etiqueta y que, entonces, la trombina pudiera actuar. En las figuras 34 A y B observamos que a pesar de la diálisis no se puede eliminar la etiqueta de histidinas (carriles 2-5) mientras que al agregar resina níquelada la proteína ya no presenta histidinas (carriles 6-9) lo cual confirma la segunda hipótesis.

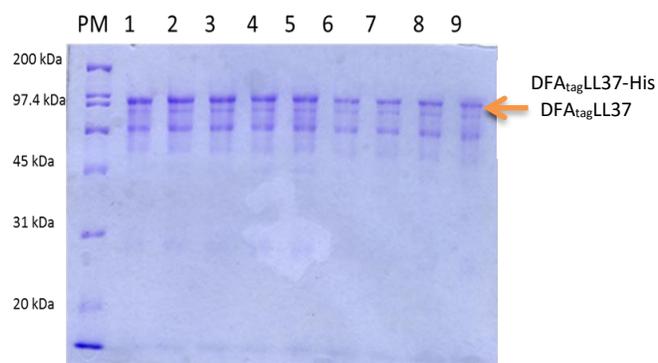


Figura 34 A. Proteína DFA_{tag}LL37-His obtenida después de la incubación para la eliminación del tallo de histidinas 1.- DFA_{tag}LL37-His sin trombina. 2.- DFA_{tag}LL37-His + 0.1 U trombina. 3.- DFA_{tag}LL37-His + 0.5 U trombina. 4.- DFA_{tag}LL37-His + 1 unidad trombina. 5.- DFA_{tag}LL37-His + 2 U trombina. 6.- DFA_{tag}LL37-His + 0.1 U trombina + resina niquelada. 7.- DFA_{tag}LL37-His + 0.5 U trombina + resina niquelada. 8.- DFA_{tag}LL37-His + 1 U trombina + resina niquelada. 9.- DFA_{tag}LL37-His + 2 U trombina + resina niquelad. PM Broad Range BioRad



Figura 34 B. Proteína DFA_{tag}LL37-His obtenida después de la incubación para la eliminación del tallo de histidinas visualizada por Western Blot anti His. Carriles 1.- DFA_{tag}LL37-His sin trombina. 2.- DFA_{tag}LL37-His + 0.1 U trombina. 3.- DFA_{tag}LL37-His + 0.5 U trombina. 4.- DFA_{tag}LL37-His + 1 U trombina. 5.- DFA_{tag}LL37-His + 2 U trombina. 6.- DFA_{tag}LL37-His + 0.1 U trombina + resina niquelada. 7.- DFA_{tag}LL37-His + 0.5 U trombina + resina niquelada. 8.- DFA_{tag}LL37-His + 1 U trombina + resina niquelada. 9.- DFA_{tag}LL37-His + 2 U trombina + resina niquelada. PM. - prestained protein ladder Fermentas

La resina niquelada facilito la interacción entre el sitio de reconocimiento de la trombina en la proteína y la enzima. Sin embargo, al dializar se precipitó una gran cantidad de proteína por lo que se cambió el pH de elución de la proteína a 5.5, condición en la que se sabe que el DFA_{tag} es más estable. Es importante mencionar que el cambio de pH no afectó la actividad de la trombina. La diálisis contra este buffer fue suficiente para evitar la precipitación de la misma, no así su hidrólisis parcial. En la figura 35 se muestra la proteína después de la diálisis.

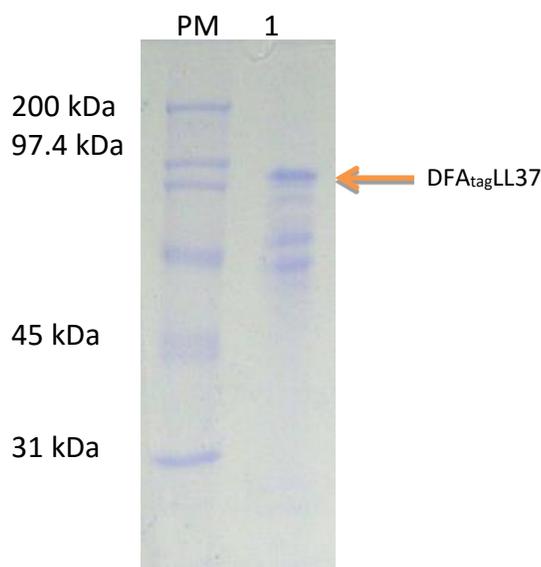


Figura 35. Proteína DFA_{tag}LL37 después de la diálisis con membrana de 50 kDa. PM. -Broad Range Ladder (aaBioRad).

7.9. Comparación de costos de purificación y obtención de la proteína activa (LL37 y DFA_{tag}LL37)

El costo de la purificación y obtención de una proteína es importante pues su uso depende de ello. En el laboratorio se ha visto que purificar proteínas utilizando almidón reduce drásticamente el costo. Para poder determinar si el costo de la producción del péptido LL37 es menor utilizando como sistema de purificación el DFA_{tag} (patente MX/a/2012/005765) contra la tradicional etiqueta de histidinas se consideraron todos los pasos de purificación y activación. Cabe señalar que para obtener el péptido LL37 sin etiqueta fue necesario utilizar dos columnas de purificación (afinidad a níquel e intercambio iónico) y resina níquelada, además de la trombina en mayor cantidad que para el DFA_{tag}LL37, provocando un aumento tanto en el costo como en el tiempo de producción. La tabla 2 muestra un desglose de los costos de obtención de las proteínas por proceso, la última columna nos indica el total de la producción de 1mg de proteína lista para su uso. Al final del proceso se obtienen 1.25 mg de LL37 y 1 mg de DFA_{tag}LL37.

Proteína obtenida a partir de un litro de medio de cultivo	purificación	Costo de la purificación (USD/mg proteína)	Eliminación de la etiqueta	Costo trombina (USD/mg proteína)	Eliminación de la trombina	Costo de la eliminación de la trombina (USD/mg proteína)	Costo total por mg de proteína (USD/mg proteína)
LL37 2.5mg/L	Columna de afinidad a níquel	20	Trombina 10 U/mg proteína	11	Columna de intercambio aniónico	30	61
DFA _{tag} LL37 1.5mg/L	Adsorción a almidón de maíz (100mg/mg proteína)	0.00017	Trombina 5U/mg proteína	5.5	Adsorción a almidón de maíz (100mg/mg proteína)	0.00017	5.50034

Tabla 2. Costo de obtención de las proteínas LL37 y DFA_{tag}LL37 activas. Los precios de cada proceso se obtuvieron según los catálogos vigentes de los proveedores y estimando la cantidad de proteína máxima que cada columna es capaz de procesar.

7.10. Pruebas de actividad antimicrobiana contra *E. coli* K12

Se realizaron pruebas de actividad antimicrobiana de la proteína DFA_{tag}LL37 contra *E. coli* K12 con sus respectivos controles, Linker-LL37 (LL37) y Linker-LL37-His (LL37-His). La incubación del microorganismo con las proteínas se realizó en líquido durante 16 h debido a la metodología pues tiempos menores podrían solo debilitar la membrana y al eliminar la proteína para el plaqueo estas podrían recuperarse dando un porcentaje de inhibición erróneo. Posteriormente se plaqueó en caja para medir las UFC, dada la naturaleza particulada del almidón que interfería en cualquiera de las pruebas usualmente utilizadas, como DO 600 nm, sensi discos o difusión en agar. El planteamiento de la metodología no fue tarea fácil dados los factores a considerar.

El primer objetivo de estas pruebas era determinar si la capacidad antimicrobiana del péptido LL37 se veía afectada por las modificaciones hechas, así como por la presencia o ausencia del His-tag, ya que existen reportes donde se menciona que la adición de uno o más aminoácidos en el carboxilo terminal afectan la capacidad de inhibición del péptido (Yang et al, 2004).

Las pruebas realizadas a la proteína LL37 tanto con etiqueta de histidinas como en ausencia de ésta (activa) se muestran en la Figura 36. En ella se observa que la proteína LL37 inhibe hasta en un 87%

el crecimiento de *E. coli* K12, a una concentración de 36 µg/mL. Vandamme *et al.* (2012) al igual que otros reportan 100% de inhibición de la misma bacteria a una concentración de 180 µg/mL, sin embargo, con el péptido obtenido en este trabajo nunca se pudo llegar a la inhibición total, a pesar de haber incrementado hasta 250 µg/mL la concentración utilizada.

Es probable que las modificaciones realizadas en los aminoácidos en el péptido (sección 7.1) causen este cambio en el comportamiento de inhibición, se ha observado que la modificación en la carga neta del péptido LL-37 de 6+ a 5+ o la adición de otros aminoácidos como la metionina elimina cualquier tipo de actividad antimicrobiana (Ramos *et al.*, 2010). Zelezetsky y Tossi (2006) reportan que la carga neta de un péptido, con características semejantes al LL-37, afecta de manera proporcional la potencia de inhibición de los mismos, una carga 3+ es lo mínimo necesario para tener actividad antimicrobiana y hasta 8+ se obtiene un máximo de la misma sin que la carga comience a afectar la estructura. El péptido que diseñamos tiene una carga de 7+ y por lo tanto no debía haber afectación de la capacidad antimicrobiana. Otro aspecto que podría considerarse en el diseño de péptidos antimicrobianos es la hidrofobicidad, ya que está relacionada con el espectro de acción. En este proyecto el péptido no cuenta con modificaciones en aminoácidos de cadenas alifáticas largas, por lo que no se espera afectación en su espectro. En este trabajo solo se observó el efecto antimicrobiano contra *E. coli* K12 por lo que serán necesarias pruebas contra otros microorganismos para poder determinar si el espectro y la capacidad se vieron alteradas debido a los cambios o si no se logró obtener la MIC para *E. coli* K12 debido a la metodología establecida.

Por otra parte, se ha observado en algunos antibióticos, como las penicilinas o las benzodiazepinas, que cuando se sobrepasa la concentración óptima para inhibir completamente el crecimiento se revierte el efecto inhibitor, este fenómeno también es conocido como el efecto paradójico o de Egel quien fue el primero en describirlo (Egel, Musselman, 1948, Mancuso *et al.*, 2004). No obstante, hay que tomar otros puntos en consideración pues las condiciones de ensayo de los reportes donde se ha obtenido un 100% de inhibición varían tanto en cepas utilizadas como en condiciones de ensayo (Tabla 3).

En la Figura 36 se muestra el efecto de la presencia de la etiqueta de histidinas, claramente afecta de manera significativa la capacidad inhibitoria del péptido. Al utilizar 36 µg/mL del LL37-His el porcentaje de inhibición en comparación con la proteína sin etiqueta disminuye de 87% a 37%. Se requieren concentraciones tan altas como 250 µg/mL de LL37-His para obtener un porcentaje de

inhibición semejante a los 36 µg/mL de la proteína activa (sin etiqueta). Un resultado semejante, donde se veía una disminución de actividad antimicrobiana al tener aminoácidos extra en el carboxilo terminal ya había sido reportado por Ramos *et al.* (2010).

NOTA: Los porcentajes de inhibición obtenidos son con respecto al control positivo tomando el número de UFC obtenidas como referencia.

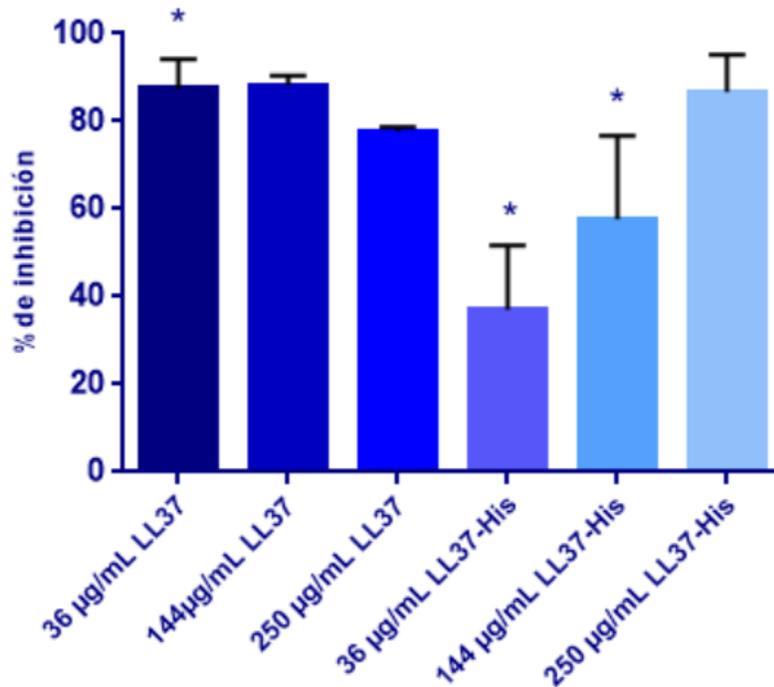


Figura 36. Inhibición del crecimiento de *E. coli* K12 a diferentes concentraciones de Linker-LL37 (LL37) con y sin tallo His. * Estadísticamente diferentes $P > 0.05$.

Péptido	Concentración inhibitoria 100%	Cepa de <i>E. coli</i>	Test	Referencia
M-LL37-D	No hubo inhibición. No mencionan las concentraciones probadas.	<i>E. coli</i> K12	DO 620nm incubación con el péptido overnight a 37°C	Ramos et al., 2010
P-LL37	180µg/mL	<i>E. coli</i> K12	DO 620nm incubación con el péptido overnight 37°C	Ramos et al., 2010
GSLI-39	12.5 µg/mL	<i>E. coli</i> DH5α	Conteo de colonias. Incubación con el péptido overnight 37°C	Yang et al., 2004

Tabla 3. Concentración inhibitoria de péptidos análogos al LL37 expresados en *E. coli*.

Dentro de los objetivos del trabajo se buscó establecer si el péptido antimicrobiano mantenía su actividad al ser inmovilizado, por lo que se fusionó con el DFA_{tag}, una proteína que ha demostrado su capacidad para inmovilizar proteínas recombinantes sobre almidón insoluble permitiendo mantener la función de la proteína fusionada (Guillen et al., 2013).

Se probó el efecto antimicrobiano de la fusión realizando nuevamente la incubación de *E. coli* con las proteínas obtenidas en su forma soluble (DFA_{tag}LL37) o inmovilizada en los gránulos (DFA_{tag}LL37-almidón). Los porcentajes de inhibición obtenidos en las pruebas realizadas con la proteína de fusión DFA_{tag}LL37 son dependientes del LL37 presente en ella. Las concentraciones que se presentan en las gráficas para el DFA_{tag}LL37 fueron normalizados con respecto al porcentaje que representa el LL37 en la proteína de fusión.

La figura 37 muestra la comparación del porcentaje de inhibición del péptido LL37 en sus diferentes versiones. Como era de esperarse el DFA_{tag} por sí solo no presenta actividad antimicrobiana y es el control negativo. El LL37 se utilizó como el control positivo. La fusión DFA_{tag}LL37 no inhibe a 36 µg/mL de LL37, para poder obtener el 87% de inhibición obtenido con el péptido sólo se requieren 144 mg/mL de LL37 en la proteína de fusión. Estos resultados indican que el DFA tiene un efecto negativo en la proteína LL37 disminuyendo su actividad 4 veces, esto probablemente debido a que el dominio, que es aproximadamente siete veces mayor que el péptido obtenido en este trabajo, enmascara al péptido o no lo permita interactuar adecuadamente con la proteína. Sin embargo, resulta interesante notar que al inmovilizar el péptido sobre el almidón se recupera un 40% de la actividad, como si la inmovilización del DFA_{tag} sobre el almidón liberara al LL37 para actuar. El efecto entonces observado del DFA_{tag} es igual al de la presencia de 6 histidinas en el carboxilo-terminal (40 vs 37% de inhibición).

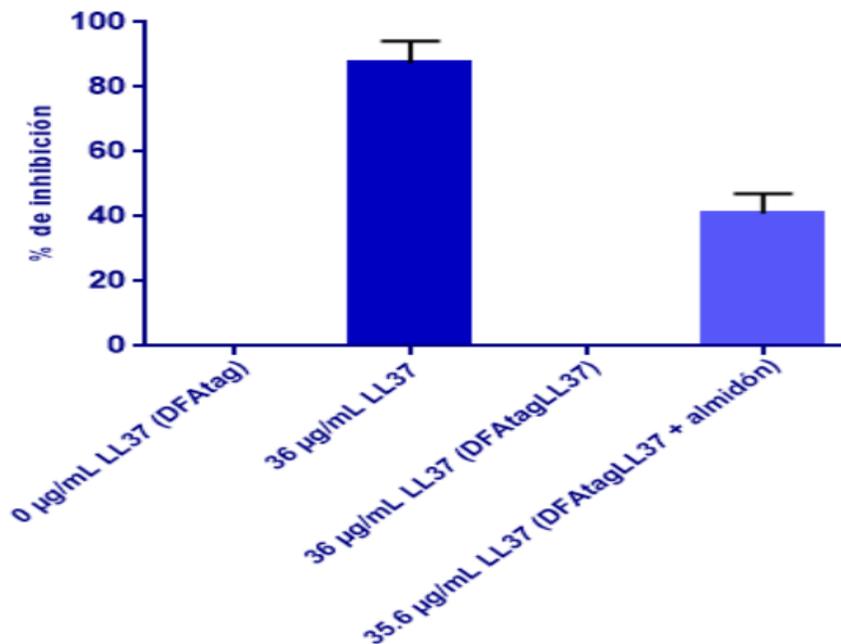


Figura 37. Inhibición del crecimiento de *E. coli* K12 a la misma concentración de LL37 en DFA_{tag}LL73 no inmovilizado e inmovilizado. DFA_{tag} (patente MX/a/2012/005765) como control negativo, LL37 como control positivo.

El efecto provocado por la inmovilización de la proteína se observa en la Figura 38 donde los porcentajes de inhibición obtenidos al utilizar diferentes concentraciones de DFA_{tag}LL37 inmovilizada en almidón van en aumento, de manera lineal, con respecto a la concentración del péptido. Es decir, hay un comportamiento dependiente de dosis. Aunque no se logró llegar al 100% de inhibición se observa una tasa de cambio de 2.43% de inhibición por μg de LL37. Una aproximación teórica indica que se necesita una concentración de 58.21 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LL37 inmovilizado para tener el 100% de inhibición concentración mucho menor que aquella requerida por la misma proteína no estando inmovilizada para obtener un 87% de inhibición y 1.6 veces más que aquella obtenida por el péptido LL37 en este trabajo para obtener igualmente un 87% de inhibición.

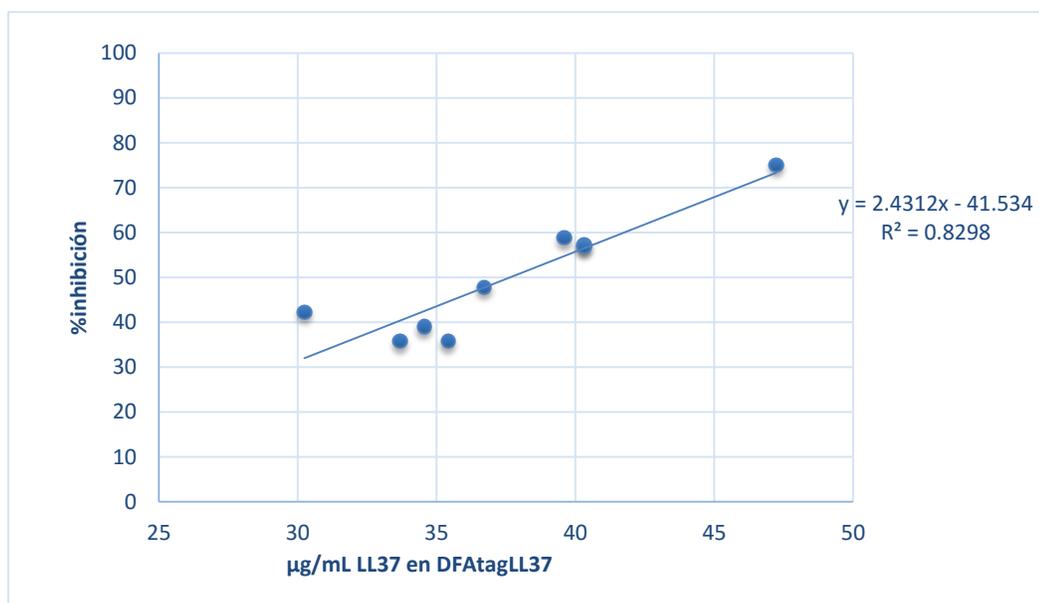


Figura 38. Inhibición del crecimiento de *E. coli* K12 a diferentes concentraciones de LL37 en DFA_{tag}LL37 inmovilizado en almidón de maíz.

Una ventaja adquirida de esta proteína importante de mencionar es la capacidad de unirse al almidón lo que permite no solo que el péptido pueda expresarse de manera recombinante sino también purificarse de una manera más sencilla y de bajo costo (Tabla 2) además de la posibilidad de reusarse.

El siguiente paso sería realizar pruebas antimicrobianas contra diferentes microorganismos indistintos de Gram para establecer un espectro de actividad. Además, se podría desarrollar un empaque con contenido conocido de almidón para poder inmovilizar al péptido. Las pruebas realizadas en los bioplásticos actualmente disponibles no permiten la unión de la proteína DFA_{tag} en cantidad adecuada (Flores, 2016).

Además, esto podrá permitir el desarrollo de tecnologías en áreas como la de alimentos o clínica para utilizar este tipo de péptidos bioactivos sin liberarlos en el producto. Por ejemplo, se propone utilizarla con membranas biodegradables o empaques no tóxicos y funcionales en el área de alimentos, lo que permitiría aumentar la vida de anaquel o disminuir la carga microbiana en productos perecederos sin afectar la calidad del alimento, pues al estar inmovilizado éste no puede difundir, a diferencia de membranas ya existentes que usan ácidos orgánicos o quelantes como agentes antimicrobianos que difunden al alimento modificando las características del producto o que pueden resultar tóxicos al consumidor, lo que hace su uso limitado (Siracusa *et al.*, 2008, Appendini, Hotchkiss, 2002).

En el área clínica actualmente existen muchos desarrollos con péptidos antimicrobianos para ser utilizados como una nueva generación de antibióticos por lo que poder expresar y purificar de manera sencilla y a bajo costo a los mismos podría impulsar su uso. El sistema almidón-DFA_{tag}LL37 podría ser aplicado en parches de almidón para mantener la piel de los quemados hidratada y evitar el desarrollo de microorganismos, lo cual podría traducirse en una recuperación más rápida (Otvoz, Ostorhazi, 2015), además este podría ser utilizado como pomada o ungüento para aquellas personas que presentan enfermedades de la piel por la disminución en la expresión o procesamiento de este péptido como dermatitis atópica o diabetes (Reinholz *et al.*, 2012, Otvöz, Ostorhazi, 2015). Una última aplicación sería utilizar la pomada para ayudar a la cicatrización de heridas en la piel o en maquillaje para evitar el acné. Nuevamente al estar el péptido inmovilizado su efecto antimicrobiano podría ser más duradero pues estaría constantemente desestabilizando la membrana de las bacterias.

Para poder desarrollar estas aplicaciones del sistema es necesario optimizarlo. La optimización más importante y que se debe realizar a corto plazo es aumentar la cantidad de proteína unida al almidón, ya sea realizando una diálisis aún más exhaustiva o buscando otro carbohidrato distinto a la β -ciclodextrina o a la maltosa (no permite observar la etiqueta de histidinas) o en su defecto intentar la expresión de la proteína sin tallo de histidinas esperando que el DFA_{tag} (patente MX/a/2012/005765) sea suficiente para enmascarar el efecto toxico del péptido durante la producción. Moon y col (2005) observaron que la proteína LL37 se podía expresar de manera recombinante si se le agregaba un dominio lo suficientemente grande como la GST sin afectar el crecimiento de *E. coli* BL21, pues este sería capaz de “secuestrar” al péptido.

Aún y cuando en la literatura se pueden encontrar péptidos antimicrobianos provenientes de catelicidinas con alta capacidad inhibitoria como la catelicidina-BF proveniente del veneno de una serpiente (*Bungarus fasciatus*) que presenta 100% inhibición contra *E. coli* ATCC 25922 a una concentración de 2 μ g/mL (He *et al.*, 2015) y la melitina aislada del veneno de abeja (Habermann, 1972); la ventaja de usar al LL37 es su origen humano lo que básicamente eliminaría cualquier posibilidad de toxicidad en el hombre. Otros péptidos como la nisina, cuyas funciones como bactericida han sido probadas al mismo tiempo de demostrar ser inocuos al humano y que son ampliamente utilizados en la industria de alimentos no ha sido posible producirlos de manera recombinante debido a su estructura compleja, pues requieren de modificaciones postraduccionales que provocan una expresión pobre en otros lactococcus y que requieren complementación de genes (Chan-Ick *et al.*, 2004) y por tanto no permiten su expresión en *E. coli*.

8. Conclusiones

Se diseñó y construyó la proteína recombinante deseada y se logró su expresión de manera heteróloga en *E. coli* Rosetta 2 tanto en fusión como sola.

Se encontró que 6 histidinas en el carboxilo son suficientes para inhibir la actividad de la proteína mientras es producida.

Se obtuvieron los siguientes rendimientos de proteína inactiva: 1.5 mg/L de medio de cultivo para el DFA_{tag}LL37-His y 2.5 mg/L de medio de cultivo para el LL37-His y de proteína activa: 1.25 mg de LL37 y 1 mg de DFA_{tag}LL37. También se determinó que DFA_{tag}LL37 tiene un menor costo de producción.

Se evaluó la capacidad inhibitoria del LL37 a 3 concentraciones diferentes 36 µg/mL, 144 µg/mL y 250 µg/mL. Los porcentajes de inhibición obtenidos fueron 87%, 88% y 78% respectivamente. Al mismo tiempo se demostró que las histidinas disminuyen su actividad, los porcentajes para la proteína con estas fueron de 37%, 47% y 66% para las mismas concentraciones

Se probó la capacidad inhibitoria la proteína de fusión DFA_{tag}LL37 inmovilizada a cuatro concentraciones diferentes de LL37 32 µg/mL, 35.6 µg/mL, 40 µg/mL, y 47 µg/mL y libre a 2 concentraciones distintas 36 µg/mL y 144 µg/mL. Los porcentajes de inhibición obtenidos para la proteína inmovilizada fueron 39%, 41%, 58% y 75% respectivamente mientras que para la proteína libre fueron 0% y 88%.

Los porcentajes de inhibición de la proteína libre e inmovilizada muestran que la inmovilización favorece la actividad microbiana en un 40%. Sin embargo, la proteína LL37 tiene una mayor capacidad de inhibición que aquella inmovilizada. A pesar de ser mejor el porcentaje de inhibición de la proteína que no contiene el DFA este le proporciona una ventaja pues además de tener un bajo costo de producción la inmovilización de este péptido permitirá el desarrollo de aplicaciones como empaques biodegradables bioactivos que

permitan alargar la vida de anaquel de los alimentos, el desarrollo de ungüentos y parches con este péptido que ayudará en lesiones de la piel o enfermedades como dermatitis atópica entre otras cosas.

Bibliografía

Appendini P., Hotchkiss J.H., Review of antimicrobial food packaging (2002), *Innovative food, Science & Emerging Technologies*, 3 pp. 113-126.

Boraston A.B., Bolam D.M., Gilbert H.J., Davies G.J., Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition (2004), *Biochemistry Journal*, 382 pp. 769-781.

Boraston A.B., Healey M., Klassen J., Ficko-Blean E., Lammerts van Bueren A., Law V., A structural and functional analysis of α -glucan recognition by family 25 and 26 carbohydrate-binding modules reveals a conserved mode of starch recognition (2006), *The Journal of Biological Chemistry*, 281 pp. 587-598.

Boraston A.B., Ficko-Blean E., Healy M., Carbohydrate recognition by a large sialidase toxin from *Clostridium perfringens* (2007), *Biochemistry* 46 pp. 11352-11360.

Buick R., Leszczyńska K., Namiot A., Sokołowski W., Cathelicidin LL-37: A multitask antimicrobial peptide (2010), *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 58 pp. 15–25.

Chan-Ick Cheigh, Hoon Park, Hak-Jong Choi & Yu-Ryang Pyun, Enhanced nisin production by increasing genes involved in nisin Z biosynthesis in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 (2004), *Biotechnology Letters* 27 pp. 155–160.

Eagle H, Musselman AD., The rate of bactericidal action of penicillin in vitro as a function of its concentration, and its paradoxically reduced activity at high concentrations against certain organisms (1948), *Journal of Experimental Medicine*, 88 (1) pp. 99–131

Flores Hernandez Nydia Cinthya, Inmovilización de proteínas en bioplásticos (2016) Tesis de Licenciatura Facultad de Química, UNAM.

Guillen D., Santiago M., Linares L., Perez R., Morlon J., Ruiz B., Sanchez S., Rodríguez-Sanoja R., Alpha-amylase starch binding domains: cooperative effects of binding to starch granules of multiple tandemly arranged domains (2007), *Applied and environmental microbiology*, vol. 73 no. 12 pp. 3833-3837.

Guillén D., Sánchez S., Rodríguez-Sanoja R., Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles (2010), *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85 pp. 1241-1249.

Guillén D., Moreno-Mendieta S., Aguilera P., Sánchez S., Farrés A. and Rodríguez-Sanoja R., The starch-binding domain as a tool for recombinant protein purification (2013), *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97 pp.4141-4148.

Hancock R.E.W., Chapple D., Minireview: Peptide Antibiotics (1999), *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43:6 pp.1317-1323

Hancock R. E. W. & Rozek A., Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides (2002). *FEMS Microbiology Letters*, 206 pp.143–149.

He Q., Fu A., Li T., Expression and one-step purification of the antimicrobial peptide cathelicidin-BF using the intenin system in *Bacillus subtilis* (2015), *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42 pp.647–653

Mancuso C.E.; Tanzi M.G.; Gabay M., Paradoxical reactions to benzodiazepines: Literature review and treatment options (2004), *Pharmacotherapy*, 24 (9) pp. 1177–1185

Moon J.Y., Henzler-Wildman K.A., Ramamoorthy A., Expression and purification of a recombinant LL-37 from *Escherichia coli* (2005), *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758 pp. 1351-1358.

Morlon-Guyot, J., Mucciolo-Roux, F., Rodríguez-Sanoja, R. and Guyot, J.P., Characterization of the *L. manihotivorans* α -amylase gene (2001), *DNA Seq.*, 12 pp. 27-37.

Otvos Jr.L., Ostorhazi E., Therapeutic utility of antibacterial peptides in wound healing (2015), *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 13:7 pp. 871-881

Pinto da Costa M., Cova M., Ferreira R., Vitorino R., Antimicrobial peptides: an alternative for innovative medicines? (2015), *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99 pp. 2023-2040

Ramos R., Domingues L., Gama M., *Escherichia coli* expression and purification of LL37 fused to a family III carbohydrate-binding module from *Clostridium thermocellum* (2010), *Protein Expression and Purification*, 71 pp. 1-7

Reinholz M., ruzicka T., Schaubert J., Cathelicidin LL-37: An antimicrobial peptide with role in inflammatory skin disease (2012), *Annals of Dermatology*, 24:2 pp.126-132

Rodriguez-Sanoja R., Morlon-Guyit J., Pintado J., Jugr N., Guyot J.P., Comparative characterization of complete and truncated forms of *Lactobacillus amylovorus* α -amylase and role of the C-terminal direct repeats in raw-starch binding (2000), *Applied and environmental microbiology*, 66:8 pp. 3350-3356.

Rodriguez-Sanoja R., Oviedo N., Sanchez S., Microbial starch-binding domain (2005), *Current opinion in microbiology*, 8 pp. 260-267.

Rodriguez-Sanoja R., Oviedo N., Escalante L., Ruiz B., Sanchez S., A single residue mutation abolishes attachment of the CBM26 starch-binding domain from *Lactobacillus amylovorus* α -amylase (2009), *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 36 pp. 341-346.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., *Molecular cloning: a laboratory manual* 2nd ed. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory.

Santiago M., Linares L., Sanchez S., Rodríguez-Sanoja R., Functional characteristics of the starch binding domain of *Lactobacillus amylovorus* α -amylase (2005). *Biologia*, 60 pp. 111-114.

Shu-Chuan L., Wei-Ting L., Shi-Hwei L., Wei-I C., Bor-Kai H., I-Ping L., Chia-Chin S., Margaret Dah-Tsy C., Role of the linker region in the expression of *Rhizopus oryzae* glucoamylase (2007), *BMC Biochemistry*, 8:9

Siracusa V., Rocculi P., Romani S., Rosa M.D., Biodegradable polymers for food packaging: a review (2008), *Trends in food science and technology*, 19 pp. 634-643.

Vandamme D., Landuyt B., Luyten W., Schoofs L., A comprehensive summary of LL-37, the lactoferrin human cathelicidin peptide (2012), *Cellular Immunology*, 280 pp. 22-35.

Yang Y.H., Zheng G.G., Li G., Zhang X.J., Cao Z.Y., Rao Q., Wu K.F., Expression of bioactive recombinant GSLL-39, a variant of human antimicrobial peptide LL-37, in *Escherichia coli*, (2004), *Protein expression and purification*, 37 pp 229-235.

Zelezetsky I., Tossi A., Alpha-helical antimicrobial peptides—using a sequence template to guide structure–activity relationship studies (2006), *Biochimica ET Biophysica Acta*, 1758:9 pp. 1436-1449.

Apéndices

I. Extracción de plásmido

1. Se inoculan 100 mL de medio LB-amp (100 µg/mL) al 1% y se deja crecer overnight a 37°C.
2. Se colectan las células en tubos falcon y se centrifuga a 13,000 rpm por 5 min a 4°C.
3. Se elimina el sobrenadante y resuspende el pellet en 500 µL de la solución I, en seguida se adicionan 1000 µL de solución II (se prepara al momento) y se mezclan por inversión cuidando de abarcar toda la superficie del tubo, posteriormente se agregan 300 µL solución III y se vortexea gentilmente el tubo en posición invertida durante 10 s. Se deja reposar el tubo en hielo de 3 a 5 min.
4. Al sobrenadante se le adicionan dos volúmenes de etanol absoluto, se mezcla y se deja a -20 °C por 30 min se centrifuga a 13,000 rpm por 10 min a 4 °C.
5. se elimina el sobrenadante y agrega al pellet 1 volumen de etanol al 70% se mezcla hasta que se desprenda del fondo del tubo, después se centrifuga a 13,000 rpm por 10 min a 4 °C.
6. nuevamente se elimina el sobrenadante y se deja secar el pellet a 37 °C, por último, se resuspende el botón en 10 µL de TE (pH 8.0), conteniendo RNAasa (20 µg/mL), y se incuba a 55 °C por 30 min y cuantifica a 260 mn

Solución I	Solución II	Solución III
50 mM Glucosa	0.2 NaOH	5 M CH ₃ COOK 60 mL
25 mM Tris-HCl pH 8	1% SDS	CH ₃ COOH 11.5 mL
10 mM EDTA pH 8		H ₂ O 28.5 mL

II Electroforesis de Agarosa

1. Se prepara una solución de agarosa 0.8% o 1% en el buffer TAE, la solución se calienta para que se disuelva, sin dejar agregados suspendidos.
2. Se coloca la solución en la cámara de electroforesis y se deja que solidifique.
3. La muestra de ADN se mezcla con tampón de carga a una concentración final 1X, y esta es colocada en el gel.
4. La electroforesis se lleva a cabo a 6 v/cm hasta que el pigmento haya migrado a $\frac{3}{4}$ partes a lo largo del gel.
5. El gel de agarosa se coloca en la solución de Bromuro de etidio para tinción de 10 a 15 min, posteriormente se observa en el transiluminador de UV para examinar la migración de fragmentos de ADN y su peso molecular se observa en luz U.V.

Reactivos:

- ✓ Agarosa
- ✓ Buffer de carga 6X Tipo III:
 - 0.25% azul de bromofenol
 - 0.25% Cianol FF de xileno 4°C
 - 30% glicerol en agua

- ✓ Buffer TAE (Tris. acetatos-EDTA) 50X:
 - 245 gr Tris base
 - 57.1 mL ácido acético glacial
 - 100 mL EDTA 0.5M (pH 8.0)

III. Preparación de células electro competentes.

1. Se inoculan 400 mL de medio LB al 1% con un precultivo de *E. coli*. Las células se incuban a 37 °C con agitación hasta obtener una DO_{600} de 0.4 a 0.6.
2. Las células se cosechan, por centrifugación a.
3. Se elimina el sobrenadante (medio) y resuspende el pellet en un volumen de agua mega pura estéril y fría, después se centrifuga 10000 rpm por 15 min a 4 °C.
4. se elimina el sobrenadante y resuspende en 200mL de agua mega pura estéril y se centrifuga a 10000 rpm a 4 °C por 15 min.
5. Se elimina el sobrenadante y resuspende el pellet en 8mL de glicerol al 10% frío e inmediatamente se centrifuga a 10000 rpm a 4 °C por 15 min.
6. Por último se elimina el sobrenadante y el pellet se resuspende en un volumen final de 1.2mL de glicerol al 10% frío, se alícuota la muestra en tubos Eppendorf con 50 μ L cada uno, almacenándolos a -70 °C.

IV. Electro-Transformación

1. se toman 50 μ L de células competentes (un tubo) se le adiciona de 1-2 μ g de plásmido y se incuba en hielo por 1 min.
2. La mezcla de ADN y células se colocan en una celda de electroporación fría. La celda se deposita en el electroporador, y se le da un pulso de 1.25 V a una constante de tiempo de 4-5 ms y 12.5

kV/cm. Inmediatamente después se le adicionan 950 μ L de medio SOC y rápidamente se resuspenden las células con una micropipeta.

3. Se transfieren las células a un tubo de 1.5 mL y se incuban a 37 °C en agitación continua por 1 h, después se plaquea la muestra en medio LB con el antibiótico marcador del plásmido y/o la cepa.

V. Geles SDS-PAGE.

1. Se ensamblan las placas de vidrio para formar el gel, y se comprueba de que no haya fugas.

2. Se prepara el gel de acrilamida al 12% (gel separador) y se colocan 3.45 mL dentro de las placas para evitar que haya poca uniformidad en la superficie del gel se puede colocar un poco de agua destilada.

4. Después de la polimerización, se remueve el agua destilada de las placas se vacía 1 mL el gel al 4% o concentrador, y se colocan los peines que dan lugar a la formación de los pozos evitando que se formen burbujas.

Geles de acrilamida (2) 30%/Bis:

Reactivo	Gel de Concentración 4%	Gel de Separación 10%
Acrilamida/Bis 30%	532 μ L	3.32 mL
Tris.HCl 0.5M, pH 6.8	1.0 mL	—
Tris.HCl 1.5M, pH 8.8	—	2.5 mL
SDS 10%	40 μ L	100 μL
Agua destilada	2.42 mL	4 mL
Temed	4.4 μ L	5.5 μL
Persulfato de amonio 10%	22 μ L	55 μL
Total	4 mL	10mL

6. Se precorren los geles 15 min. a 20 mA, después del tiempo transcurrido se colocan las muestras.

7. se toman 15 μL de muestra en tubos eppendorff, las células se disuelven en 5 μL de tampón de muestra y se hierven durante 5 min. Se colocan en hielo mientras son cargadas en el gel.

8. Los geles se corren a 20 mA, hasta $\frac{3}{4}$ partes, en una cámara de electroforesis para proteínas (Bio-Rad) con tampón de migración 1X.

Tampón de muestra 4x:

H₂O destilada	8.5 mL
Tris HCl 0.5M, pH 6.8	2.5 mL
Glicerol	2 mL
SDS 10%	4 mL
2-β mercaptoetanol	1 mL
Azul de bromofenol	500 μL

Tampón de migración SDS-PAGE 5x pH 8.3

Composición	Cantidad
Tris base 125 M	15 g/L
Glicina	72 g/L
SDS	5 g/L

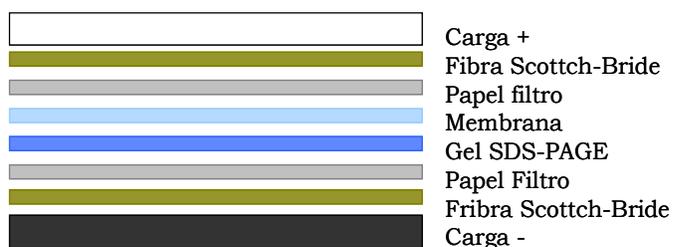
9. Se sacan los geles de la cámara y se separan los vidrios con cuidado. El gel se deposita en un recipiente con la solución de tinción durante media hora con agitación. Posteriormente esta se elimina y se agrega solución de distinción, esta se cambia tantas veces sea necesario para obtener una imagen clara.

Soluciones para el revelado de geles de poliacrilamida con azul de Coomasie

Solución Stock I	0.2 % Azul de Coomasie	
	90% Etanol	
Solución Stock II	20% Ácido acético	
2.Tinción	Stock I	50 %
	Stock II	50 %
4.Desteñir II	Etanol	20 %
	Ácido acético glacial	10 %

VI. Western Blot

1. Se corre un gel PAGE-SDS, pero no se tiñe con azul de Coomasie. Se prepara el buffer de transferencia mezclando 80 mL del buffer 10x + 80 mL de metanol y se afora a 800 mL.
2. se corta un fragmento de membrana de nitrocelulosa semejante al tamaño del gel y se activa la membrana sumergiéndola en metanol.
3. En un recipiente se humedecen las fibras y el papel filtro con el buffer y se acomodan de la siguiente manera evitando la formación de burbujas:



4. Una vez que el sándwich está listo se sumerge en el tanque de Western Blot, el cual debe contener suficiente tampón de transferencia para cubrir el ensamble.
5. Se conecta el equipo y se realiza la transferencia a 60V durante 1-1.5 h. Para evitar que aumente la temperatura la transferencia debe realizarse en un cuarto frío o enfriar el equipo con hielo.
6. Después del tiempo transcurrido se retira la membrana y se cuelga para que se seque durante una noche.
7. Para el revelado se prepara el buffer donde se sumergirá la membrana el cual, debe tener los siguientes componentes: Tampón PBS 1x, Tween 20 0.05% y Leche descremada 3%.
8. El primer anticuerpo (anti-His o anti 1DFA_{tag}) se diluye en 10 mL del buffer anterior a una concentración final de 0.2 µg/mL y se agrega la cantidad necesaria para cubrir la superficie de la membrana. Se incuba a temperatura ambiente 1.5 h con agitación ligera.
9. La membrana se lava por 5 min con 10 mL de tampón PBS 1x/Tween 0.05% 3 veces.
10. Se prepara el segundo anticuerpo (anti-IgG) de la misma forma que el primero, quedando a una concentración final 0.2 µg/mL, se incuba y se lava de igual manera.
11. Finalmente se agregan 0.8 mL de BCIP/NBT, sustrato de la fosfatasa alcalina, (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato a una concentración 0.21 g/L y nitroazul de tetrazolio a una concentración de 0.42 g/L en una base orgánica/ Tris buffer) y se llevan a 8 mL se deja actuar hasta que sean visibles las bandas y se enjuaga con agua destilada. Se deja secar.

Tampón de Transferencia 10x: 144 g/L de Glicina y 30 g/L de Tris base

Buffer de inmunolocalización PBS 10x (Buffer de fosfatos:0.01M+ NaCl 0.15M).

Anti-His ROCHE cat. No. 1922416.

Anti-Mouse IgG (Goat), AP-Labeled NEF821 Perkin-Elmer

VII. Lisis de las células y sonicación

1. Durante el proceso del rompimiento celular se mantiene todo en hielo. El botón de células inducidas se resuspende en un volumen adecuado (1.5 mL/L de medio de cultivo) de solución I (5 μ L de cóctel de inhibidor de proteasas SIGMA p-2717 de uso general y 995 μ L de tampón de fosfatos 20 mM de Na_2HPO_4 0.5 M de NaCl y 25 mM Imidazol (solo LL37), pH 7.4*) y tritón al 20% para que tenga una concentración final del 2%, la suspensión es sometida a una sonicación de 3 pulsos de 10 segundos reposando 1 min. entre cada pulso. A una amplitud de 60 Hz y se centrifuga 10000 rpm en frío por 12 min.

2. El sobrenadante se recupera en un tubo Eppendorf, y se mantiene en hielo, paralelamente se resuspende el botón en la mitad del volumen inicial de solución I, el cual se somete nuevamente a sonicación de 3 pulsos de 20 segundos reposando 1 min. entre cada pulso.

3. Se mezcla el sobrenadante del paso 1 con el sonicando del segundo paso y para el LL37 se deja en agitación suave durante 1 h; posteriormente se centrifuga a 13000 rpm en frío por 15 min.

VIII. Purificación por afinidad a níquel

1. El LL37 se filtra el sobrenadante en una membrana de 0.22 μ y el filtrado se coloca en la columna de sefarosa niquelada previamente equilibrada con buffer de unión (20 mM de Na_2HPO_4 , 0.5 M de NaCl y 25 mM de Imidazol, pH 7.4 ajustando el pH con ácido fosfórico).

2. una vez inyectada la proteína en la columna esta se lava el buffer de unión hasta que se estabilice la señal.

3. se eluye la proteína con un gradiente de buffer de elución (20 mM de Na_2HPO_4 , 0.5 M de NaCl y 250 mM de Imidazol, pH 7.4 ajustando el pH con ácido fosfórico) y colectan las fracciones para ser analizadas por PAGE-SDS

IX. Purificación por almidón y adsorción de la proteína DFA_{tag}LL37.

1. Se lavan 300 mg de almidón de maíz insoluble por litro de medio de cultivo cuatro veces con 2 mL de agua destilada estéril, (se agita durante 1 min y se centrifuga a 4000 rpm); por último, el almidón es resuspendido en 1 mL de buffer de citrato-fosfatos pH 5.5 (Cit-Ph).
2. Al sobrenadante se le agregan 300 µg de almidón previamente lavado y se incuba 2 h en frío con agitación moderada.
3. Se centrifuga a 8000 rpm 3 min. Separa el sobrenadante y agregan 10 mL del buffer con el que se resuspendió el almidón. Se agita moderadamente 5 min y se repite el proceso 4 veces centrifugando entre cada uno.
4. se agrega Buffer PBS pH=7.3 con β-ciclodextrina 9 mg/mL.
5. se observa en un gel PAGE-SDS teñido con azul de Coomasie y cuantifica a 280 nm.

X. Eliminación de etiqueta de histidinas

1. Se cuantifica la proteína a 280 nm, para el LL37 se agregan 10 U de trombina (GE healthcare) /mg de LL37. Para el DFA_{tag}LL37 se agregan 5 U de trombina/mg de proteína y 1 mL de resina equilibrada (50/50)/mg de proteína.
2. Se incuba a temperatura ambiente por 16 h. Para el DFA_{tag}LL37 con agitación moderada.
3. Para el LL37 la proteína se pasa por una columna de intercambio iónico equilibrada a pH=7.8 donde la proteína no se une y la trombina sí. Finalmente se agrega 1 mL de resina equilibrada (50/50)/mg de proteína e incuba 30 minutos con agitación. Se centrifuga a 4000 rpm y retira el sobrenadante para ser analizado por PAGE-SDS y WB. Para el DFA_{tag}LL37 se centrifuga para eliminar la resina y analiza el sobrenadante por PAGE-SDS y WB, finalmente se dializa con buffer citrato

fosfatos pH=5.5 en una membrana de 50 kDa para eliminar la β -ciclodextrina y la trombina cambiando el buffer cada 30 min durante 2 h.

Anexos

I. Secuencia del LL37 en pET 22b+

acggacatttcggctctagaaataatcttggtttaactttaagaaggagatatacatatgaaa
G H F G S R N N F V - L - E G D I H M K
tacctgctgccgaccgctgctgctggtctgctgctcctcgctgcccagccggcgatggcc
Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A M A
atggatatcggaattaattcggatccgaattcgaccagcgcgcccaccaccaccaccgcg
M D I G I N S D P N S T S A P T T T T A
accgcgaccaccaccaccgcgccgagcagcagcaccaccaccaccgcccggcagcagcagcga
T A T T T T A P S S S T T T P P S S S E
ccggcgacctttccgacgggcaacagcagcatttagcagcagatgacgatgataaaggagct
P A T F P T G N S T I S S D D D D K G A
ctgctgggcgatcttttttcggaaaagcaaaagaaaaaataggcaaagaatttaaacggata
L L G D F F R K S K E K I G K E F K R I
gtgcagcggataaaaagattttctgcggaacctggtgcccggggcagcctcgagcaccac
V Q R I K D F L R N L V P R G S L E H H
caccaccaccactgagatccggctgctaacaaaagcccgaaggaagctgagttggctgct
H H H H - D P A A N K A R K E A E L A A

Inicio

Final

Unidades repetidas

Linker

LL37

His tag

II. Tabla de concentraciones de proteína.

En la siguiente tabla (4) se muestran las concentraciones de la proteína de fusión y su concentración correspondiente de LL37. Esta normalización fue realizada para poder comparar con mayor facilidad la inhibición obtenida según el contenido de LL37. Para asegurarnos que el DFA no presentaba por si solo una afectación en el crecimiento de *E. coli* K12 se realizó una prueba con el mismo.

Prueba Proteína	Concentración (µg/mL) DFA _{tag} LL37	Concentración (µg/mL) LL37	Concentración en Grafica
250DFA _{tag} (patente MX/a/2012/005765)	DFA _{tag} (patente MX/a/2012/005765) 250	0	0 µg/mL LL37 (DFA _{tag} (patente MX/a/2012/005765))
250DFA _{tag} LL37	250	36	36 µg/mL LL37 (DFA _{tag} LL37)
1000DFA _{tag} LL37	1000	144	144 µg/mL LL37 (DFA _{tag} LL37)
222DFA _{tag} LL37 + almidón	222	32	32 µg/mL LL37 (DFA _{tag} LL37 + almidón)
247DFA _{tag} LL37 + almidón	247	35.6	35.6 µg/mL LL37 (DFA _{tag} LL37 + almidón)
278DFA _{tag} LL37 + almidón	278	40	40 µg/mL LL37 (DFA _{tag} LL37 + almidón)
328DFA _{tag} LL37 + almidón	328	47.2	47.2 µg/mL LL37 (DFA _{tag} LL37 + almidón)

Tabla 4. Concentraciones de LL37 en la proteína de fusión DFA_{tag}LL37 normalizadas de acuerdo al porcentaje de péptido presente en la proteína de fusión.

III. Pruebas de actividad antimicrobiana contra *E. coli* K12. Porcentajes de inhibición por prueba

Prueba Proteína	Concentración en Grafica	% de inhibición	Desviación estándar
36LL37	36 µg/mL LL37	87.29	6.878396
144LL37	144 µg/mL LL37	88.15	2.196462
250LL37	250 µg/mL LL37	77.72	0.867025
36LL37-His	36 µg/mL LL37-His	37.06	14.64308
144LL37-His	144 µg/mL LL37-His	47.14	22.62893
250LL37-His	250 µg/mL LL37-His	66.35	20.23058
250DFA _{tag} (patente MX/a/2012/005765)	0 µg/mL LL37 (DFA _{tag} (patente MX/a/2012/005765))	0	0
250DFA _{tag} LL37	36 µg/mL LL37 (DFA _{tag} LL37)	0	0
1000DFA _{tag} LL37	144 µg/mL LL37 (DFA _{tag} LL37)	87.94	5.139114
222DFA _{tag} LL37 + almidón	32 µg/mL LL37 (DFA _{tag} LL37 + almidón)	38.97	4.601806
247DFA _{tag} LL37 + almidón	35.6 µg/mL LL37 (DFA _{tag} LL37 + almidón)	40.83	6.235018
278DFA _{tag} LL37 + almidón	40 µg/mL LL37 (DFA _{tag} LL37 + almidón)	57.60	1.045853
328DFA _{tag} LL37 + almidón	47.2 µg/mL LL37 (DFA _{tag} LL37 + almidón)	74.84	0.190335

Tabla 5. Porcentajes de inhibición obtenidos en las pruebas de actividad antimicrobiana contra *E. coli* K12.