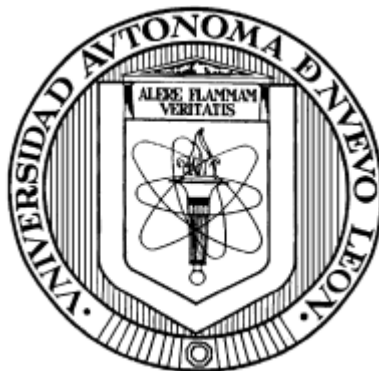


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LÉON**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS RECOMBINANTES DE INTERÉS FARMACÉUTICO EN *Escherichia coli* MARCADOS CON LAS PROTEÍNAS DE UNIÓN A METALES SmbP Y CusF3H+**

POR

**DAVID ANTONIO PÉREZ PÉREZ**

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
**DOCTORADO EN CIENCIAS con Orientación en MICROBIOLOGÍA  
APLICADA**

**NOVIEMBRE 2021**

**PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS RECOMBINANTES DE  
INTERÉS FARMACÉUTICO EN *Escherichia coli* MARCADOS CON LAS  
PROTEÍNAS DE UNIÓN A METALES SmbP Y CusF3H+**

**Aprobación de la Tesis:**

---

**DR. XRISTO ZÁRATE KALFÓPULOS**  
Presidente

---

**DR. JOSÉ RUBEN MORONES RAMÍREZ**  
Secretario

---

**DR. JESÚS ALBERTO GÓMEZ TREVIÑO**  
Vocal

---

**DRA. ALCIONE GARCÍA GONZÁLEZ**  
Vocal

---

**DR. NÉSTOR GUADALUPE CASILLAS VEGA**  
Vocal

---

**DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS**  
Sub-Directora de Posgrado

**PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS RECOMBINANTES DE  
INTERÉS FARMACÉUTICO EN *Escherichia coli* MARCADOS CON LAS  
PROTEÍNAS DE UNIÓN A METALES SmbP Y CusF3H+**

Revisión de la Tesis:

---

**DR. JOSÉ RUBEN MORONES RAMÍREZ**  
Comité Tutorial

---

**DR. JESÚS ALBERTO GÓMEZ TREVIÑO**  
Comité Tutorial

---

**DRA. ALCIONE GARCÍA GONZÁLEZ**  
Comité Tutorial

---

**DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS**  
Sub-Directora de Posgrado

## **Dedicatoria**

Dedico este proyecto a la luz de mi vida:

Ivonne y Gonzalo

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a mi familia, amigos y a todas las personas que estuvieron presentes durante la realización de este proyecto y durante mi desarrollo profesional.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, en especial a la Facultad de Ciencias Químicas por las instalaciones prestadas y los materiales brindados.

Al CONACyT por el soporte económico recibido.

Agradezco a mi asesor el Dr. Xristo Zárate Kalfópulos por todo su apoyo, y consejos durante estos tres años.

A mi comité tutorial conformado por el Dr. José Rubén Morones Ramírez, Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño, Dra. Alcione García González y Dr. Néstor Guadalupe Casillas Vega por todas sus observaciones, correcciones y tiempo invertido en este proyecto.

# TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	9
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	9
1.1 Proteínas recombinantes .....	9
1.2 Factores de crecimiento .....	9
1.3 La eritropoyetina y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos .....	11
1.4 Péptidos antimicrobianos .....	12
1.5 Los péptidos antimicrobianos LL-37 y MP1106 .....	13
1.6 <i>Escherichia coli</i> como organismo hospedero para la producción de proteínas recombinantes .....	16
1.7 CusF y SmbP .....	17
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	19
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	19
2.1 Las proteínas de fusión SmbP y CusF .....	19
2.2 Producción de eritropoyetina .....	20
2.3 Producción de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos .....	21
2.4 Producción de MP1106 .....	22
2.5 Producción de LL-37 .....	23
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	24
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	24
3.1 HIPÓTESIS .....	24
3.2 Objetivo general .....	24
3.3 Objetivos específicos .....	25
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	26
<b>4. METODOLOGÍA DE TRABAJO</b> .....	26
4.1 Construcción de los plásmidos .....	27
4.1.1 Resuspensión de las secuencias que codifica para la Eritropoyetina, GM_CSF, MP1106 y LL-37 .....	27
4.1.2 Transformación de los plásmidos .....	28
4.1.3 Extracción del ADN plasmídico .....	28
4.1.4 Digestión de los plásmidos .....	29
4.1.5 Digestión de los plásmidos pET30a-SmbP y pET30a-CusF3H+ .....	29

4.1.6 Ligación de los plásmidos pET30a-SmbP y pET30a-CusF3H+ con los insertos .....	29
4.1.7 Transformación de los plásmidos .....	30
4.1.8 Extracción de ADN plasmídico .....	30
4.1.9 Análisis confirmatorio por PCR de las colonias seleccionadas .....	30
<b>4.2 Expresión de eritropoyetina, GM-CSF, MP1106 y LL-37 .....</b>	<b>31</b>
4.2.1 Transformación de <i>E. coli</i> Origami™ 2(DE3) y <i>E. coli</i> BL21(DE3) .....	31
4.2.2. Expresión a pequeña escala de las proteínas recombinantes .....	32
4.2.4. Análisis del sobrenadante por SDS-PAGE .....	33
4.2.5. Análisis del sobrenadante por Tricina SDS-PAGE.....	33
4.2.6 Escalamiento usando 1 L de medio de cultivo.....	34
4.2.7 Lisis celular .....	35
<b>4.3 Purificación de proteínas .....</b>	<b>35</b>
4.3.1 Tipos de técnicas empleadas para la purificación de las proteínas .....	35
4.3.2. Diálisis para la remoción de imidazol.....	37
<b>4.4 Cuantificación de proteínas por el método Bradford .....</b>	<b>37</b>
<b>4.5 Corte de la proteína de fusión .....</b>	<b>38</b>
<b>4.6 Evaluación de la actividad antimicrobiana de LL-37 y MP1106.....</b>	<b>38</b>
<b>CAPÍTULO 5 .....</b>	<b>40</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
<b>5.1 Secuencias de eritropoyetina, GM-CSF, MP1106 y LL-37 optimizada para su expresión en <i>E. coli</i>.....</b>	<b>40</b>
<b>5.2 Digestión de los plásmidos.....</b>	<b>42</b>
<b>5.3 Construcción de los plásmidos .....</b>	<b>46</b>
5.3.1 Construcción de pET30a-SmbP-GM_CSF y pET30a-CusF3H+-GM_CSF46	
5.3.2 Construcción de pET30a-SmbP_WtEpo, pET30a-CusF3H+_WtEpo, pET30a-SmbP_LysEpo, pET30a-CusF3H+_LysEpo.....	48
5.3.3 Construcción de los plásmidos para la expresión de MP1106 y MP1106 tándem.....	49
5.3.4 Construcción de los plásmidos para la expresión de LL-37 y LL-37 tándem .....	51
<b>5.4 Expresiones a pequeña escala .....</b>	<b>53</b>
5.4.1 Expresión a pequeña escala de pET30a-SmbP_WtEpo, pET30a-CusF3H+_WtEpo, pET30a-SmbP_LysEpo, pET30a-CusF3H+_LysEpo. ....	53
5.4.2 Expresión a pequeña escala de pET30a-PelB-SmbP-GM_CSF .....	54
5.4.3 Expresiones a pequeña escala de SmbP/CusF3H+ MP1106 y SmbP/CusF3H+ MP1106 tándem .....	55

5.4.4 Expresiones a pequeña escala de SmbP/CusF3H+ LL-37 y SmbP/CusF3H+ LL-37 tándem .....	56
<b>5.5 Expresiones a 1 L de medio de cultivo .....</b>	<b>57</b>
5.5.1 Expresión de GM-CSF a 1 L de medio de cultivo y purificación mediante la resina Profinity™ .....	57
5.5.2 Expresión de SmbP_MP1106 a 1 L de medio de cultivo y purificación mediante IMAC empleando el sistema cromatográfico ÄKTA prime plus .....	58
5.5.3 Expresión de SmbP_LL-37 a 1 L de medio de cultivo y purificación mediante IMAC empleando el sistema cromatográfico ÄKTA prime plus .....	59
<b>5.6 Cuantificación de proteínas por el método Bradford .....</b>	<b>60</b>
<b>5.7 Corte de la proteína de fusión .....</b>	<b>61</b>
<b>5.8 Evaluación de la actividad antimicrobiana de MP1106 y LL-37 .....</b>	<b>63</b>
<b>CAPÍTULO 6 .....</b>	<b>65</b>
<b>6. Discusiones .....</b>	<b>65</b>
<b>6.1 Discusión de resultados .....</b>	<b>65</b>
<b>CAPÍTULO 7 .....</b>	<b>76</b>
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>76</b>
<b>CAPÍTULO 8 .....</b>	<b>78</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>79</b>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1. Resumen de las diversas estrategias para la producción de AMP recombinantes.</b> (A) Optimización de codones, (B) Expresión en tándem, (C) Uso de proteínas de fusión, (D) Expresión híbrida [28].	15
<b>Figura 2. Estrategia general de trabajo.</b>	26
<b>Figura 3.- Representación esquemática de las construcciones en tándem.</b>	27
<b>Figura 4. Secuencia de GM-CSF optimizada para su expresión en <i>E. coli</i>.</b>	40
<b>Figura 5. Secuencias de la eritropoyetina optimizada para su expresión en <i>E. coli</i>. (A) WtEpo y (B) LysEpo.</b>	41
<b>Figura 6. Secuencia de MP1106 optimizada para su expresión en <i>E. coli</i>.</b>	42
<b>Figura 7. Secuencia de LL-37 optimizada para su expresión en <i>E. coli</i>.</b>	42
<b>Figura 8. Gel de agarosa al 0.7% de la digestión de pUC57_GM-CSF.</b> Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Digestión del plásmido pUC57 (2700 pb) el cual contenía la secuencia de DNA que codifica para GM_CSF (380 pb).	43
<b>Figura 9. Gel de agarosa al 0.7% de la digestión de pUC57-WtEpo y pUC57-LysEpo.</b> Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Digestión del plásmido pUC57 (2700 pb) el cual contenía la secuencia de DNA que codifica para WtEpo (504 pb) y Carril 3: Digestión del plásmido pUC57 (2700 pb) el cual contenía la secuencia de DNA que codifica para LysEpo (504 pb).	44
<b>Figura 10. Gel de agarosa al 0.7% de la digestión de pUC57-MP1106 y pUC57-MP1106 Tándem.</b> Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Digestión del plásmido pUC57 (2700 pb) el cual contenía la secuencia de DNA que codifica para MP1106 (120 pb) y Carril 3: Digestión del plásmido pUC57 (2700 pb) el cual contenía la secuencia de DNA que codifica para MP1106 Tándem (450 pb).	45
<b>Figura 11. Gel de agarosa al 0.7% de la digestión de pUC57_LL-37 y pUC57_LL-37 Tándem.</b> Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Digestión del plásmido pUC57 (2700 pb) el cual contenía la secuencia de DNA que codifica para LL-37 (111 pb) y Carril 3: Digestión del plásmido pUC57 (2700 pb) el cual contenía la secuencia de DNA que codifica para LL-37 Tándem (423 pb).	46
<b>Figura 12. Gel de agarosa al 0.7% de la amplificación de pET30a-SmbP_GM-CSF.</b> Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2 y 5: Construcción SmbP_GM-CSF (944 pb), Carril 3: Control negativo (sin ADN molde) y Carril 4: Control Negativo.	47
<b>Figura 13. Gel de agarosa al 0.7% de la amplificación de CusF3H+_GM-CSF.</b> Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2 y 3: Construcción CusF3H+_GM-CSF (934 pb), Carril 4: Control negativo (sin ADN molde) y Carril 5: Control Negativo.	48
<b>Figura 14. Gel de agarosa al 0.7% de las construcciones de Epo.</b> Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Control SmbP_Stop (514 pb), Carril 3: Construcción SmbP_WtEpo (1018), Carril 4: Construcción SmbP_LysEpo (1018 pb), Carril 5: Control CusF3H+_Stop (505), Carril 6: Construcción CusF3H+_WtEpo (1009 pb), Carril 7: Construcción CusF3H+_LysEpo (1009) y Carril 8: Control negativo (sin ADN molde).	49
<b>Figura 15. Gel de agarosa al 0.7% de la amplificación de pET30a-CusF3H+_MP1106 y pET30a-CusF3H+_MP1106 tándem.</b> Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Construcción pET30a-CusF3H+_MP1106 (589 pb), Carril 3: Construcción pET30a-CusF3H+_MP1106 Tándem (972 Pb), Carril 4: Control negativo (sin ADN molde), Carril 5: Control pET30a (367 pb) y Carril 6: Control negativo (sin polimerasa).	50

<b>Figura 16. Gel de agarosa al 0.7% de la amplificación de pET30a-SmbP_MP1106 y pET30a-SmbP_MP1106 Tándem.</b> Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Construcción pET30a-SmbP_MP1106 (598 pb), Carril 3: Construcción pET30a-SmbP_MP1106 Tándem (981 Pb), Carril 4: Control negativo (sin ADN molde), Carril 5: Control pET30a (367 pb) y Carril 6: Control negativo (sin polimerasa).....	51
<b>Figura 17. Gel de agarosa al 0.7% de la amplificación de pET30a-CusF3H+_LL-37 y pET30a-CusF3H+_LL-37 Tándem.</b> Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Construcción pET30a-CusF3H+_LL-37 (580 pb), Carril 3: Construcción pET30a-CusF3H+_LL-37 Tándem (945 Pb), Carril 4: Control negativo (sin ADN molde), Carril 5: Control pET30a (367 pb) y Carril 6: Control negativo (sin polimerasa).....	52
<b>Figura 18. Gel de agarosa al 0.7% de la amplificación de pET30a-SmbP_LL-37 y pET30a-SmbP_LL-37 Tándem.</b> Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Construcción pET30a-SmbP_LL-37 589 pb), Carril 3: Construcción pET30a-SmbP_LL-37 Tándem (954 Pb), Carril 4: Control negativo (sin ADN molde), Carril 5: Control pET30a (367 pb) y Carril 6: Control negativo (sin polimerasa).....	53
<b>Figura 19. Expresión a pequeña escala de Epo.</b> Carril 1: Marcador de peso molecular, Carriles 2,3: Control SmbP_Stop, Carriles 4 y 5: SmbP_WtEpo, Carriles 6 y 7: SmbP_LysEpo, Carriles 8 y 9: Control CusF3H+_Stop, Carriles 10 y 11: CusF3H+_WtEpo y Carriles 12 y 13: CusF3H+_LysEpo.....	54
<b>Figura 20. Expresión piloto de GM-CSF.</b> Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Control y Carriles 3, 4 y 5: PeIB-SmbP-GM_CSF. ....	55
<b>Figura 21. SDS-PAGE al 12% de la expresión piloto de MP1106 y MP1106 Tándem.</b> Carril 1: Marcador de peso molecular, Carriles 2 y 3: CusF3H+-MP1106 (15.5 kDa), Carriles 4 y 5: SmbP-MP1106 (15.5 kDa), Carriles 6 y 7: CusF3H+-MP1106 Tándem (27.5 kDa), Carriles 8 y 9: SmbP-MP1106 Tándem (27.5 kDa) y Carril 10: Control. ....	56
<b>Figura 22. SDS-PAGE al 12% de la expresión piloto de LL-37 y LL-37 Tándem.</b> Carril 1: Marcador de peso molecular, Carriles 2 y 3: CusF3H+_LL-37 (15.5 kDa), Carriles 4 y 5: SmbP_LL-37 (15.5 kDa), Carriles 6 y 7: CusF3H+_LL-37 Tándem (27.5 kDa), Carriles 8 y 9: SmbP_LL-37 Tándem (27.5 kDa) y Carril 10: Control.....	57
<b>Figura 23. SDS-PAGE al 12% de la purificación de PeIB-SmbP-GM_CSF mediante cromatografía de afinidad.</b> Carril 1: marcador de peso molecular, Carril 2: Control, Carril 3: PeIB-SmbP-GM_CSF sin purificar, Carril 4: Fracción no unida, Carril 5: fracción de Lavado y Carril 6, 7 y 8: fracciones de elución.....	58
<b>Figura 24. Tricina SDS-PAGE al 13.5% de la purificación de SmbP_MP1106.</b> Carril 1: Marcador de peso molecular, Carriles 2: SmbP_MP1106 antes de la purificación, Carriles 3: Fracción no unida y Carriles 4-8: Fracciones de elución. ....	59
<b>Figura 25. Tricina SDS-PAGE al 13.5% de la purificación de SmbP_LL-37.</b> Carril 1: Marcador de peso molecular, Carriles 2: SmbP_LL-37 antes de la purificación, Carriles 3: Fracción no unida y Carriles 4-9: Fracciones de elución. ....	60
<b>Figura 26. Gráfica de la curva de calibración del método de Bradford a 595 nm.</b>	61
<b>Figura 27. Tricina SDS-PAGE al 15% de SmbP_MP1106 después del corte con enteroquinasa.</b> Carril 1: marcador de peso molecular, Carril 2: SmbP_MP1106 purificado por IMAC, Carril 3: SmbP_MP1106 después del corte con enteroquinasa. .	62
<b>Figura 28. Tricina SDS-PAGE al 15% de SmbP_LL-37 después del corte con enteroquinasa.</b> Carril 1: marcador de peso molecular, Carril 2: SmbP_LL-37 purificado por IMAC, Carril 3: SmbP_LL-37 después del corte con enteroquinasa.....	62

**Figura 29. Actividad antimicrobiana de SmbP\_MP1106 y MP1106 libre usando el método CFU.** La actividad antimicrobiana fue probada en *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Una solución amortiguadora de 50 mM Tris-HCl and 500 mM NaCl fue usada como control negativo. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (\*\*,  $p < 0,05$  según la prueba t de Student) en comparación con el control.

..... 63

**Figura 30. Actividad antimicrobiana de SmbP\_LL-37 y LL-37 libre usando el método CFU.** La actividad antimicrobiana fue probada contra A) *Escherichia coli* ATCC 25922 y B) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Una solución amortiguadora de 50 mM Tris-HCl y 500 mM NaCl fue usada como control negativo. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (\*\*,  $p < 0,05$  según la prueba t de Student) en comparación con el control.

..... 64

## NOMENCLATURA

°C	Grado Celsius
µg	Microgramo
µL	Microlitros
µM	Micromolar
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BSA	Albúmina de Suero Bovino
DH5α	Cepa <i>E. coli</i>
dNTP's	Desoxirribionucléotidos
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FPLC	Fast protein liquid chromatography
HCl	Ácido clorhídrico
IMAC	Immobilized metal affinity chromatography
IPTG	Isopropil-B-D-tiogalactopiranosido
kDa	Kilodaltones
L	Litro
LB	Caldo Luria Bertani
M	Molar
mAu	Miliunidades de absorbancia
mg	Miligramos
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
ng	Nanogramos
nM	Nanomolar
nm	Nanómetros
OmpA	Proteína de membrana externa A
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PeIB	Pectato liasa B
pmoles	Picomoles
RPM	Revoluciones por minuto
S	Segundos
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SmbP	Proteína pequeña de unión a metales
TAE	Tris-ácido acético-EDTA

## RESUMEN

**David Antonio Pérez Pérez**

**Fecha de Graduación:** Noviembre, 2021

**Universidad Autónoma de Nuevo León**

**Facultad de Ciencias Químicas**

**Título del Estudio:** PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS RECOMBINANTES DE INTERÉS FARMACÉUTICO EN *Escherichia coli* MARCADOS CON LAS PROTEÍNAS DE UNIÓN A METALES SmbP Y CusF3H+

**Número de páginas:** 94

**Candidato para el grado de  
Doctorado en Ciencias con  
Orientación en Microbiología  
Aplicada**

**Área de Estudio:** Microbiología molecular

**Propósito y Método de Estudio:** El objetivo del presente estudio es el desarrollo de una metodología para la producción de diversas proteínas y péptidos de interés farmacéutico utilizando SmbP y CusF3H+ como proteínas de fusión y *Escherichia coli* como hospedero. Para lograr este propósito se emplearon diversas técnicas de microbiología y biología molecular para la construcción de los plásmidos, los cuales fueron introducidos en el hospedero para expresar los metabolitos de interés. Después de la expresión se usaron técnicas cromatográficas para la purificación de las proteínas y péptidos, para posteriormente probar la actividad biológica de las moléculas obtenidas.

**Contribuciones y conclusiones:** En este estudio se obtuvieron catorce construcciones para la expresión de los péptidos antimicrobianos MP1106 y LL-37 y de las proteínas eritropoyetina y GM-CSF. Los resultados mostraron que tanto SmbP como CusF3H+ son capaces de producir MP1106, LL-37 y GM-CSF solubles, y que estos pueden ser purificados mediante IMAC, en adición a esto, este estudio demostró que los péptidos marcados con SmbP poseen actividad antimicrobiana y tienen un alto grado de pureza después de tan solo un paso de purificación.

A grandes rasgos, este proyecto describe una estrategia rápida y sencilla para la expresión y purificación de diversos metabolitos de interés farmacéutico.

# **CAPÍTULO 1**

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Proteínas recombinantes**

Las proteínas recombinantes son aquellas proteínas que se obtienen al expresar un gen clonado en una línea celular distinta a la original, su producción es de vital importancia ya que la obtención por fuentes naturales es costosa e insuficiente para cubrir la demanda actual [1].

El uso de proteínas y péptidos recombinantes con fines terapéuticos ha crecido significativamente desde la introducción de la insulina humana como terapia para la diabetes en 1982 [2].

En la actualidad son usados como terapia para diversas enfermedades más de 200 proteínas y péptidos recombinantes [1], entre los que se encuentran las interleucinas, los interferones, la hormona del crecimiento humana, la hormona paratiroidea y la asparaginasa, por mencionar algunos [3].

### **1.2 Factores de crecimiento**

A principios de 1900, los científicos reconocieron la presencia de factores circulantes que regulan la hematopoyesis (Tabla 1); tomó aproximadamente 50

años desarrollar sistemas de cultivo celular *in vitro*, los cuales demostraron que el crecimiento y la supervivencia de las células sanguíneas tempranas requieren la presencia de factores circulantes específicos, llamados factores de crecimiento hematopoyético [4].

**Tabla 1.** Factores de crecimiento hematopoyético y su función.

<b>Factor</b>	<b>Peso molecular (kDa)</b>	<b>Célula diana</b>	<b>Función</b>
<b>Eritropoyetina</b>	34-39	Progenitores eritroides	Aumentar el recuento de glóbulos rojos
<b>Factor estimulante de colonias de granulocitos</b>	18	Progenitores de granulocitos y neutrófilos maduros	Aumentar el recuento de neutrófilos
<b>Factor estimulante de granulocitos y macrófagos</b>	14-35	Progenitores de granulocitos y macrófagos y progenitores de eosinófilos	Aumenta el recuento de neutrófilos, eosinófilos y monocitos
<b>Factor de células madre</b>		Progenitores de granulocitos-eritroides, progenitores linfoides y células asesinas naturales	Aumenta las células madre pluripotentes y las células progenitoras
<b>Trombopoyetina</b>	35	Células madre, megacariocitos y progenitores eritroides	Aumentar el recuento de plaquetas

En los últimos años ha aumentado de forma considerable el número de pacientes con insuficiencia renal relacionada a cáncer y quimioterapia, lo cual desencadena cuadros severos de anemia. En la actualidad más 323 millones de personas padecen de insuficiencia renal crónica [5], debido a esto, la terapia con factores de crecimiento hematopoyético juega un papel importante en el tratamiento de esta enfermedad. Los agentes estimulantes de la eritropoyesis pueden reducir la severidad de la anemia y los requerimientos transfusionales en los pacientes, mientras que el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) puede reducir las complicaciones neutropénicas [6].

### **1.3 La eritropoyetina y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos**

La eritropoyetina es una glicoproteína producida principalmente por el riñón, es el principal factor que regula la producción de eritrocitos. La eritropoyetina induce la proliferación, diferenciación y maduración de las células progenitoras eritroides e inhibe la apoptosis, lo que resulta en un aumento de la producción de eritrocitos [7]. La eritropoyetina logra sus efectos al causar la homodimerización del receptor Epo con la posterior autofosforilación de la tirosina quinasa JAK2 y la fosforilación del propio receptor, así como varias proteínas del sustrato, lo que lleva a la regulación de una serie de vías de señalización y la activación de la transcripción génica [8].

La eritropoyetina está compuesta por 166 aminoácidos y tiene una masa molecular de ~35kDA. Aproximadamente el 40% del peso de la molécula madura es debido a las glicosilaciones que presenta, tres son N-glicosilación (N24, N38 y N83) y una O-glicosilación (S126) [9].

El factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) es una citoquina importante para la estimulación de la proliferación, diferenciación y supervivencia de muchas células hemopoyéticas, incluidos los neutrófilos maduros, los macrófagos y las células dendríticas [10]. Está compuesta por 127 aminoácidos pesa aproximadamente 23 kDa y posee dos puentes disulfuro. Es secretada por macrófagos, células T, mastocitos, células NK, células endoteliales y fibroblastos en respuesta a citoquinas u otros estímulos inmunes o inflamatorios [11].



#### **1.4 Péptidos antimicrobianos**

Desde el descubrimiento de la penicilina en 1982 un gran número de antibióticos han sido usado para tratar diversas enfermedades infecciosas, sin embargo, con el tiempo las bacterias han ido desarrollando resistencia a estos compuestos [12].

Al aparecer las bacterias resistentes a los tratamientos usados comúnmente se hizo evidente la necesidad de nuevos antibióticos u otros recursos antibacterianos. En este sentido, los péptidos antimicrobianos (AMPs) han llamado la atención como un posible candidato que puede extraerse de fuentes naturales y utilizarse contra bacterias resistentes a los antibióticos [13]. A la fecha, más de 5,000 AMPs han sido descubiertos o sintetizados [14].

Los AMPs son moléculas conocidas por ser componentes esenciales de la respuesta inmune innata que también pueden participar en ciertos organismos como inmunomoduladores [15].

Estos péptidos tienen un tamaño de entre 10-50 aminoácidos y, por lo general, poseen actividad antimicrobiana de amplio espectro [16]. Se caracterizan por tener en su estructura una cantidad abundante de residuos catiónicos (arginina y lisina) lo que les confiere una carga neta positiva, además, tienen una alta proporción (más de 50%) de aminoácidos hidrofóbicos [17].

Los AMPs son moléculas muy variadas, por lo cual, no existe un mecanismo de acción en común para todos estos péptidos, sin embargo, generalmente para las especies bacterianas el contacto inicial con los AMPs se

basa en una atracción electrostática entre las moléculas aniónicas en la superficie de la célula bacteriana y los residuos catiónicos de los AMPs. Específicamente, los AMPs se sienten atraídos por lipopolisacáridos presentes en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas y por los ácidos lipoteicoicos de la pared celular de las bacterias Gram-positivas. Una vez que los AMPs atraviesan la pared celular pueden interactuar con lípidos cargados negativamente (como el fosfatidilglicerol y la cardiolipina) causando alteraciones en la membrana. Debido a su composición anfipática también se pueden insertar dentro de la bicapa lipídica dando como resultado cambios en la curvatura de la membrana y cambios en la permeabilidad de la bicapa lipídica [17–19].

Hasta ahora, se han aprobado varios AMPs para su comercialización, entre los que destacan la bacitracina, nisina, daptomicina, gramicidina, colistina y polimixina B [20].

### **1.5 Los péptidos antimicrobianos LL-37 y MP1106**

El LL-37 es un péptido humano del tipo catelicidina producido por una gran variedad de células entre las que se encuentran los leucocitos y las células epiteliales [21].

Este péptido actúa como inmunomodulador y promueve la cicatrización, además de esto tiene la capacidad de interactuar con los lipopolisacáridos o ácidos teicoicos presentes en la membrana de las bacterias, al interactuar con

estos componentes LL-37 es capaz de permeabilizar la membrana lo que le confiere una actividad antibacteriana de amplio espectro [22, 23].

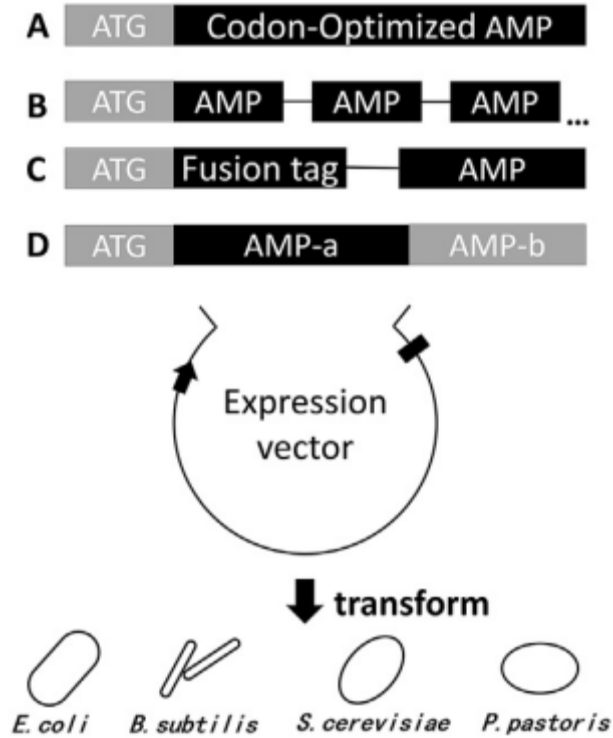
Estructuralmente, el LL-37 es un péptido lineal de 37 aminoácidos con un gran número de residuos de lisina y arginina en su estructura. Tiene un peso de 4.5 kDa y no posee ninguna modificación postraduccional [24].

La plectasina es un péptido de 40 aminoácidos producido por el hongo *Pseudoplectania nigrella* tiene un peso de 4.4 kDa y posee 3 puentes disulfuro (Cys4–Cys30, Cys15–Cys37 y Cys19–Cys39) [25]. La plectesina posee actividad antibacteriana selectiva por las bacterias Gram positivas, esto se debe a que se une directamente al Lípido II, el cual es un precursor esencial en la pared bacteriana de las gran positivas [26].

Con el objetivo de aumentar la actividad antimicrobiana de la plactesina Cao *et al* (2014) sustituyeron 4 aminoácidos en su estructura, se remplazaron los aminoácidos en las posiciones 9, 11, 14 y 36 con aminoácidos con carga positiva, a este nuevo péptido se le llamo MP1106 [27].

A pesar del gran poder bactericida con el que cuentan estos péptidos antimicrobianos, el bajo rendimiento de producción y el costoso proceso de extracción y purificación limitan su aplicación en el área de la medicina.

Existen diversas estrategias usadas para producir péptidos antimicrobianos (Figura 1).



**Figura 1. Resumen de las diversas estrategias para la producción de AMP recombinantes.** (A) Optimización de codones, (B) Expresión en tándem, (C) Uso de proteínas de fusión, (D) Expresión híbrida [28].

La expresión en tándem se usa comúnmente para aumentar la producción de los AMPs, en esta estrategia, se ponen diversas copias del gene para aumentar el nivel de transcripción y así mejorar el rendimiento de la expresión de proteínas. En el caso de la expresión híbrida, dos péptidos antimicrobianos con diferentes propiedades se fusionan para generar un nuevo AMP que presenta no solo un alto rendimiento de expresión sino también una mayor actividad antimicrobiana y una baja citotoxicidad contra las células del hospedero [28].

## **1.6 *Escherichia coli* como organismo hospedero para la producción de proteínas recombinantes**

Las proteínas recombinantes pueden ser expresadas en una amplia gama de hospederos como lo son las bacterias, levaduras, células de mamífero, plantas, algas unicelulares y animales transgénicos [29].

Los tres sistemas de expresión más usados para la producción de péptidos y proteínas heterólogas son *E. coli* (aprox. 31%), levaduras (*S. cerevisiae* y *P. pastoris* aprox. 15%) y células de mamíferos (aprox. 43%) [30].

*E. coli* es el hospedero más usado para la producción de proteínas recombinantes, ya que la producción económica y rápida de grandes cantidades de proteína heteróloga [29, 31–33].

Para usar *E. coli* como hospedero en la producción de AMPs se deben de resolver dos problemas principales. Primero, la naturaleza antibacteriana de los péptidos los hace potencialmente fatales para *E. coli* y en segundo, el tamaño pequeño de los péptidos y su alta propiedad catiónica los hace altamente susceptibles a la degradación proteolítica. Los dos problemas antes mencionados se pueden resolver usando proteínas de fusión [34].

Las proteínas de fusión son generadas por la unión de dos o más genes que codifican para proteínas distintas, lo que da como resultado un polipéptido con propiedades funcionales de ambas proteínas [35].

El uso de este tipo de proteínas es vital al producir proteínas recombinantes ya que no solo aumenta su solubilidad, también aumentan los niveles de expresión de la proteína, favorecen el correcto plegamiento y facilitan la purificación [32, 36].

## 1.7 CusF y SmbP

CusF es una proteína periplásmica que forma parte del complejo CusCBFA presente en *E. coli* que se encarga de regular las concentraciones de plata y cobre, CusF puede ser usada como proteína de fusión en la expresión de proteínas recombinantes. El polipéptido maduro es pequeño (9.9 kDa) y posee una estructura de forma de barril con 5 plegamientos beta [37].

Las proteínas recombinantes marcadas con CusF se pueden purificar mediante cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC), utilizando iones de Cu(II). Debido a que se quería optimizar el proceso de purificación se creó CusF3H<sup>+</sup> que es una mutante de CusF a la cual se le han agregado 3 histidinas en el N-terminal para fomentar la afinidad a iones Ni(II), ya que con éstos se obtiene mayor pureza que utilizando Cu(II) [38].

La proteína pequeña de unión a metales (SmbP por sus siglas en inglés) es también una proteína de 9.9 kDa aislada del periplasma de *Nitrosomonas europaea*. La proteína madura es un monómero de sólo 93 aminoácidos que tiene la capacidad de unirse a diferentes iones metálicos divalentes como Cu, Ni y Zn; por lo tanto, se ha propuesto que es una proteína de eliminación de metales en *N. europaea* para hacer frente a las altas concentraciones de cobre [39].

Con la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos convencionales, se ha hecho clara la necesidad de nuevos antimicrobianos, en la actualidad la producción de éstos es insuficiente para cubrir las necesidades de la población [40], de igual forma, la alta demanda de factores de crecimiento y su costo elevado los hace de difícil acceso para la población en general, por lo cual es de suma importancia el desarrollo de sistemas de expresión y purificación eficientes

que sean capaces de producir diversos tipos de proteínas y péptidos con la finalidad de disminuir los costos de producción. Por este motivo en este proyecto se propone utilizar CusF3H+ y SmbP como proteínas de fusión para la expresión y purificación de dos péptidos con potente actividad antimicrobiana como lo son el MP1106 y LL-37 en *E. coli* y de las proteínas de interés farmacéutico eritropoyetina y GM-CSF.

## CAPÍTULO 2

### 2. ANTECEDENTES

#### 2.1 Las proteínas de fusión SmbP y CusF

Cantú-Bustos *et al.* (2016) utilizaron por primera vez CusF como proteína de fusión. Para observar el desempeño de CusF, se expresaron la proteína rojo fluorescente, proteína verde fluorescente, proteína reguladora de respuesta de LovK y proteína hipocótilo corto 2. Los resultados obtenidos se compararon contra los resultados de dos de las proteínas de fusión más usadas, MBP y GST. Los niveles de expresión obtenidos con CusF son similares a los obtenidos con MBP y GST lo que indica que CusF pudiera ser usado como proteína de fusión para la expresión de proteínas de interés farmacéutico [37].

Vargas-Cortez *et al.* (2016) utilizaron SmbP para la expresión de proteínas recombinantes, este es el primer reporte del uso de SmbP como proteína de fusión. Se expresaron diversas proteínas como la proteína rojo fluorescente, o la proteína reguladora de respuesta de LovK y los resultados se compararon contra los resultados obtenidos por las proteínas de fusión, MBP y GST. SmbP obtuvo resultados similares a los obtenidos por MBP y GST, las cuales son dos de las proteínas de fusión más usadas en la actualidad [39].



Vargas-Cortez *et al.* (2017) crearon CusF3H+ al agregar 3 histidinas en el N-terminal de la proteína CusF. CusF3H+ a diferencia de la proteína nativa permite la purificación con IMAC usando iones Ni(II), lo cual, da como resultado mayor pureza, esto, sin alterar sus cualidades como proteína de fusión (mejorar expresión y solubilidad) [38].

## 2.2 Producción de eritropoyetina

O. Narhi *et al.* (2001) realizaron la expresión de eritropoyetina usando como hospedero *E. coli*. A la eritropoyetina se le mutaron las asparaginas en las posiciones 24, 38 y 83 a lisina, esto con la finalidad de aumentar el punto isoeléctrico de la proteína y su carga neta positiva, disminuyendo su tendencia a agregarse a pH neutro o por debajo de él, debido a las interacciones electrostáticas. La proteína obtenida se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico [41].

Macmillan *et al.* (2001) mutaron a la eritropoyetina cambiando las asparaginas en las posiciones 24, 38 y 83 por cisteínas esto con la finalidad de realizar una glicosilación *in vitro* utilizando N-glicosil yodoacetamida. Este reactivo tiene como blanco los grupos tiol libres de la cisteína. La proteína se purificó usando una etiqueta de histidinas como proteína de fusión y IMAC. Se obtuvieron 13 mg/L de eritropoyetina [42].

Wang Yin *et al.* (2010) produjeron eritropoyetina usando como hospedero *E. coli*. La proteína se obtuvo como cuerpos de inclusión los cuales tuvieron que ser replegados y adicionalmente se realizó una pegilación para aumentar el

tiempo de vida media de la proteína. Para la purificación de la proteína se usó tanto cromatografía de intercambio iónico como cromatografía de exclusión por tamaño obteniendo un 98% de pureza [43].

Jeong Taeck-Hyun *et al.* (2014) usaron MBP como proteína de fusión para la expresión de la eritropoyetina en el citoplasma de *E. coli*. La proteína producida se purificó mediante cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión molecular. Después del proceso de purificación se obtuvieron 7.2 mg/L de cultivo de eritropoyetina soluble, activa y con un grado de pureza mayor al 95% [8].

Grunina T.M. *et al.* (2017) realizaron tres construcciones para la producción de eritropoyetina en *E. coli*. La primera construcción con MBP como proteína de fusión, la segunda MBP junto con una etiqueta de histidinas y la tercera una etiqueta de histidinas más el péptido S (oligopéptido derivado de ribonucleasa pancreática bovina). La proteína obtenida usando MBP como proteína de fusión resultó ser imposible de purificar debido a que la dificultad de separar MBP de eritropoyetina. Usando el péptido S se obtuvieron 0.55 mg de eritropoyetina por gramos de biomasa con una pureza de 99.9% [44].

### **2.3 Producción de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos**

Jazii *et al.* (2007) produjeron GM-CSF en el espacio periplásmico de *E. coli*. La proteína fue extraída de la bacteria mediante choque osmótico. Llevaron a cabo una precipitación con sulfato de amonio y posteriormente una cromatografía

de intercambio aniónico obteniendo proteína con un grado de pureza de 95% [45].

Schwanke *et al.* (2009) expresó GM-CSF usando como hospedero *E. coli* obteniendo cuerpos de inclusión los cuales fueron solubilizados usando urea y polisorbato 20, obteniendo un rendimiento final de 0.4 mg/L de cultivo con una actividad comparable al producto comercial [46].

Krishna *et al.* (2011) usaron tiorredoxina como proteína de fusión para producir 44 mg/L de GM-CSF en *E. coli*. La proteína se purificó mediante IMAC y se obtuvo de forma soluble y bioactiva. Las pruebas de actividad biológica se llevaron a cabo usando la línea celular TF-1 [47].

Thomson Christy *et al.* (2012) produjeron GM-CSF en *E. coli* como cuerpos de inclusión, los cuales fueron replegados usando cloruro de guanidina. La proteína obtenida fue purificada mediante IMAC, se obtuvieron aproximadamente 7 mg/ L de cultivo con actividad comparable al producto comercial. Las pruebas de actividad biológica se llevaron a cabo usando la línea celular TF-1 [10].

## **2.4 Producción de MP1106**

Cao *et al.* (2014) diseñaron el péptido MP1106 a partir de la plectasina. A la plectasina se le modificaron 4 aminoácidos, se reemplazaron los aminoácidos en las posiciones 9, 11, 14 y 36 con aminoácidos con carga positiva. Una vez diseñado el nuevo péptido se produjo en usando a *P. pastoris* como hospedero. La expresión duró 120 h, el sobrenadante con la proteína se liofilizó, posteriormente se resuspendió en agua y se purificó mediante cromatografía de

intercambio catiónico. Al finalizar el proceso se obtuvieron 831 mg de MP1106 con una pureza de 94.68%.

Jiao *et al.* (2014) expresaron MP1106 usando *P. pastoris* como hospedero, la expresión del MP1106 duró 120 h. La purificación del péptido se realizó mediante cromatografía de intercambio catiónico y se obtuvieron 100 mg por litro de MP1106 con una pureza del 95.2% [48].

## **2.5 Producción de LL-37**

Moon *et al.* (2007) produjeron LL-37 en *E. coli*. Usaron GST como proteína de fusión y purificaron el péptido obtenido mediante cromatografía de afinidad. Cortaron la proteína de fusión usando Factor Xa y posteriormente realizaron una segunda purificación mediante HPLC en fase reversa, obteniendo 0.3 mg de LL-37 por litro de cultivo [49].

Li *et al.* (2011) expresaron LL-37 en *E. coli* usando tiorredoxina (THX) y S Tag como proteínas de fusión. Entre la proteína de fusión y el LL-37 colocaron el sitio de corte de la trombina. Usaron IMAC para la primera purificación y después de el corte de la proteína de fusión con trombina usaron cromatografía por exclusión de tamaño para la segunda purificación obteniendo 4.3 mg de LL-37 por litro de cultivo [50].

Li *et al.* (2012) usaron una etiqueta dual de SUMO-THX para expresar LL-37 en *E. coli*. Se utilizaron IMAC y SEC para la purificación y se obtuvieron 2.4 mg de LL-37 por litro con una pureza >95% [51].

## CAPÍTULO 3

### 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 3.1 HIPÓTESIS

Utilizando SmbP y CusF3H+ como proteínas de fusión y *Escherichia coli* como organismo hospedero se producirán MP1106 con una pureza de al menos 90% y mostrando actividad antimicrobiana contra *S. aureus* a un MIC menor a 5  $\mu$ M y LL-37 con una pureza del 90 % y actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *S. aureus* a un MIC menor a 50  $\mu$ M. Las proteínas de fusión también facilitarán la producción de eritropoyetina y GM-CSF recombinantes en *Escherichia coli*.

#### 3.2 Objetivo general

Expresar, purificar y evaluar la actividad biológica de los péptidos LL-37 y MP1106, así como de las proteínas eritropoyetina y GM-CSF utilizando *Escherichia coli* como hospedero y CusF3H+ y SmbP como proteínas de fusión.

### **3.3 Objetivos específicos**

- 1.- Construir plásmidos para la expresión y purificación de eritropoyetina, GM-CSF, LL-37 y MP1106 recombinantes.
- 2.- Expresión de eritropoyetina, GM-CSF, LL-37 y MP1106 en *E. coli*.
- 3.- Purificar eritropoyetina, GM-CSF, LL-37 y MP1106 recombinantes por medio de cromatografía de afinidad utilizando iones metálicos Ni(II).
- 4.- Evaluar la actividad antimicrobiana de MP1106 en *S. aureus* y de LL-37 en *E. coli* y *S. aureus*.

## CAPÍTULO 4

### 4. METODOLOGÍA DE TRABAJO

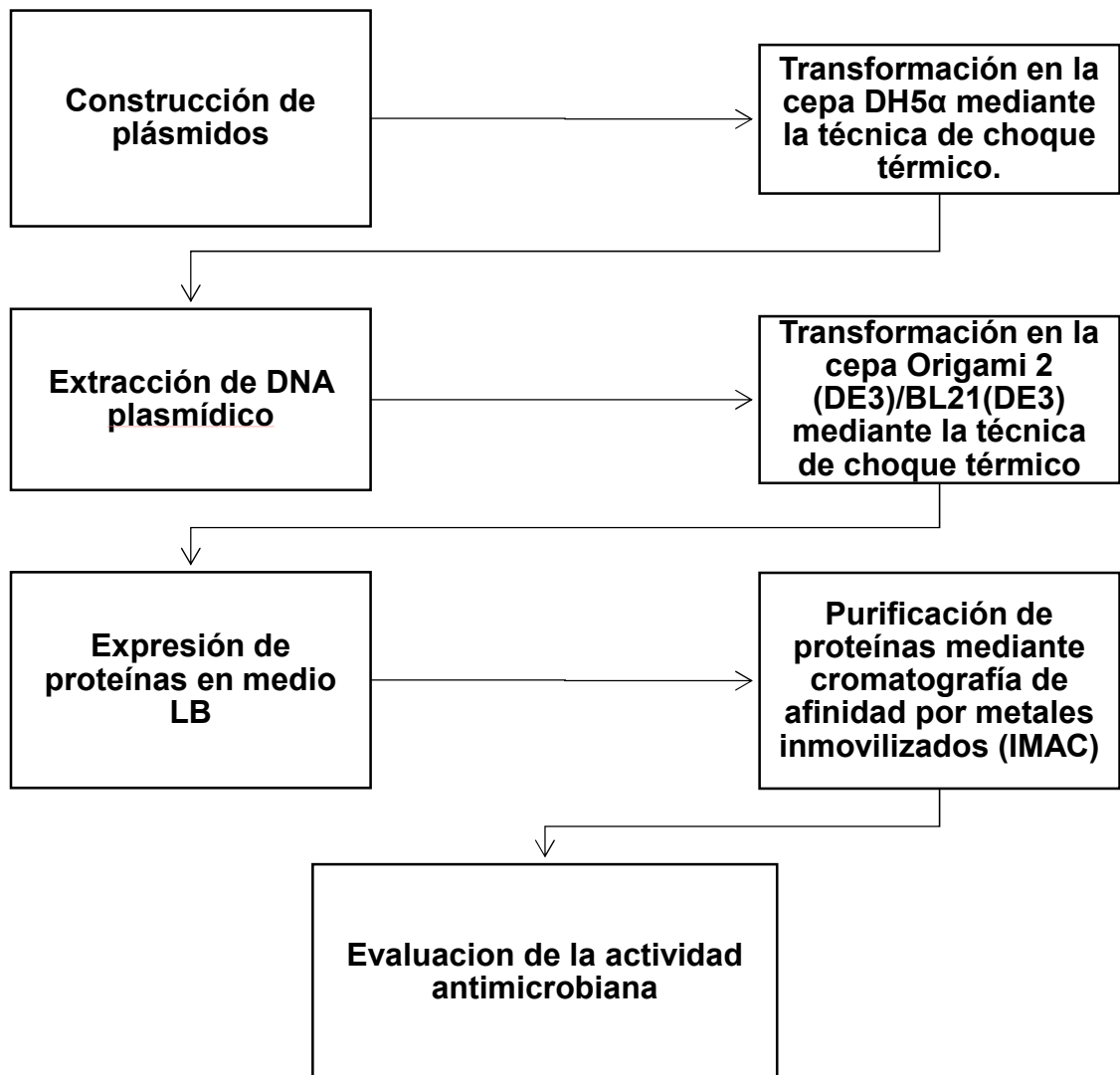


Figura 2. Estrategia general de trabajo.

## 4.1 Construcción de los plásmidos

### 4.1.1 Resuspensión de las secuencias que codifica para la Eritropoyetina, GM\_CSF, MP1106 y LL-37

Se enviaron a sintetizar dos secuencias que codifican para la eritropoyetina, a una de estas secuencias se le cambiaron las asparaginas en las posiciones 24, 38 y 83 a lisinas. A la secuencia sin modificaciones se le llamo WtEpo y a la secuencia modificada se le llamo LysEpo.

Para GM\_CSF, solo se envió a sintetizar una secuencia sin ninguna modificación.

En el caso de las secuencias que codifican para los péptidos MP1106 y LL-37 se realizaron dos construcciones adicionales en tándem de los dos péptidos. Cada tándem consistía (Figura. 2) en tres repeticiones del péptido separados por el enlace flexible (GGGGS)<sub>3</sub>.



**Figura 3.- Representación esquemática de las construcciones en tándem.**

Todas las secuencias fueron sintetizadas por GenScript, Corporation con los codones optimizados para su expresión en *E. coli*. A todas las secuencias se le agregaron los sitios de corte de las endonucleasas NcoI y XhoI para así poder insertarlas con facilidad en el plásmido pET30a.

Las secuencias liofilizadas venían contenidas en el plásmido pUC57 el cual es resistente ampilicina. El liofilizado se resuspendió en 100 µL de agua mQ para obtener una concentración final de 40 ng/mL.



#### 4.1.2 Transformación de los plásmidos

Las transformaciones se realizaron en la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Se emplearon 10 ng del plásmido (pUC57-WtEpo, pUC57-LysEpo, pUC57-GM\_CSF, pUC57-MP1106, pUC57-LL-37, pUC57-MP1106 tandem, pUC57-LL-37 tandem), los cuales, se mezclaron con 30  $\mu$ L de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  rubidio-competentes en un microtubo de 1.5 mL en hielo, esto se incubó por 25 minutos. Posteriormente se realizó un choque térmico de 45 segundos a 44 °C, al terminar se colocó nuevamente en hielo, pasados dos minutos se agregaron 800  $\mu$ L de caldo LB.

Una vez agregado el caldo LB, se mezcló suavemente y se incubó 1 h a 37 °C en agitación a 200 rpm. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugaron los tubos a 13000 rpm durante 2 minutos, se retiró el sobrenadante dejando aproximadamente de 50 a 100  $\mu$ L de caldo LB. Se resuspendieron las células en dicho volumen y se transfirieron a placas de agar LB con Ampicilina a una concentración final de 100  $\mu$ g/mL y se esparció por la placa por extensión con varilla. Se incubaron las placas durante 16 horas a 37 °C.

#### 4.1.3 Extracción del ADN plasmídico

Se seleccionaron algunas de las colonias obtenidas en las placas. Estas, se inocularon en 6 mL de caldo LB suplementado con Ampicilina a una concentración final de 100  $\mu$ g/mL y se incubaron a 37 °C durante 16 horas en agitación a 200 rpm. Se recolectó el sedimento celular centrifugando a 13,000 rpm por 2 minutos, una vez obtenido se extrajo el ADN plasmídico empleando el kit QIAPREP SPIN MINIPREP.

#### 4.1.4 Digestión de los plásmidos

Se digirieron 2000 ng de cada plásmido (pUC57-WtEpo, pUC57-LysEpo, pUC57-GM\_CSF, pUC57-MP1106, pUC57-LL-37, pUC57-MP1106 tandem, pUC57-LL-37 tandem). El volumen final de las digestiones fue de 50  $\mu$ L, las cuales estaban compuestas por ADN plasmídico, 5  $\mu$ L de solución amortiguadora 3.1 10x (NEB), 15 U de XhoI (NEB) y 15 U de NcoI (NEB) y completando a 50  $\mu$ L con agua mQ. La reacción se dejó incubando 16 horas a 37 °C, posteriormente se realizó un gel de agarosa al 0.7% usando TAE como solución amortiguadora y se purificó empleando el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION.

#### 4.1.5 Digestión de los plásmidos pET30a-SmbP y pET30a-CusF3H+

Se digirieron 2000 ng de cada plásmido. El volumen final de las digestiones fue de 20  $\mu$ L, las cuales estaban compuestas por ADN plasmídico, 5  $\mu$ L de solución amortiguadora 3.1 10x (NEB), 15 U de XhoI (NEB) y 15 U de NcoI (NEB) y completando a 19  $\mu$ L con agua mQ. La reacción se dejó incubando 2 horas a 37 °C y por último se agregó 1 U de SAP (NEB) dejando incubar por 1 hora más a 37 °C. Una vez terminada la digestión, se purificó utilizando el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION

#### 4.1.6 Ligación de los plásmidos pET30a-SmbP y pET30a-CusF3H+ con los insertos

El ADN que se usó como inserto fue el obtenido en las digestiones realizadas en el punto 4.1.4. Las 14 reacciones de ligación se llevaron a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ L y contenían los siguientes reactivos: pET30a-SmbP o pET30a-CusF3H+ digeridos ( $\approx$ 40 ng), inserto ( $\approx$ 30 ng), 2  $\mu$ L de solución

amortiguadora de ligasa 10x (BioBasic), 0.5 U de T4 DNA ligasa y completando las reacciones a 20  $\mu$ L con agua mQ.

Como control negativo se llevó a cabo una reacción sin inserto conteniendo los mismos reactivos de la reacción antes mencionada. Todas las reacciones se incubaron a 4 °C por 16 h. Finalmente, la T4 DNA ligasa se inactivó a 65 °C durante 10 minutos en baño maría.

#### 4.1.7 Transformación de los plásmidos

La transformación con los plásmidos que se obtuvieron después de la ligación se realizó de acuerdo con lo descrito en el punto 4.1.2 usando kanamicina a una concentración final de 30  $\mu$ g/mL.

#### 4.1.8 Extracción de ADN plasmídico

El procedimiento para la extracción de los plásmidos se realizó de acuerdo con lo descrito en el punto 4.1.3.

#### 4.1.9 Análisis confirmatorio por PCR de las colonias seleccionadas

Se realizó una amplificación por PCR utilizando los iniciadores T7 delantero y reverso para confirmar que las construcciones se realizaron de forma correcta. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50  $\mu$ L conteniendo los siguientes reactivos: ADN plasmídico ( $\approx$ 10 ng), 5  $\mu$ L de solución amortiguadora Taq 10x (GenScript Corporation), 3  $\mu$ L de iniciador delantero (60 pmoles), 3  $\mu$ L de iniciador reverso (60 pmoles), 1  $\mu$ L (10nM) de dNTPs, 2.5 U de Taq polimerasa (GenScript Corporation) y se completó con 36.5  $\mu$ L de agua mQ.

Como control negativo se llevó a cabo una reacción sin ADN plasmídico conteniendo los mismos reactivos de la reacción antes mencionada y se completó el volumen final con agua mQ.

La amplificación se realizó en un termociclador marca Techme (modelo <sup>3</sup>Prime) con las siguientes condiciones:

La desnaturalización inicial fue de 2 minutos a 95 °C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización por 1 minuto a 95 °C, alineamiento por 1 minuto a 55 °C y elongación por 45 segundos a 72 °C y por último una extensión final por 10 minutos a 72 °C.

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.7% con TAE como solución amortiguadora para confirmar las amplificaciones.

## **4.2 Expresión de eritropoyetina, GM-CSF, MP1106 y LL-37**

### **4.2.1 Transformación de *E. coli* Origami™ 2(DE3) y *E. coli* BL21(DE3)**

Para la expresión de las construcciones de eritropoyetina y MP1106 se usó la cepa de *E. coli* Origami™ 2(DE3) como hospedero y para la expresión de las construcciones de GM-CSF y LL-37 se usó *E. coli* BL21(DE3). Para la transformación se emplearon 10 ng del ADN plasmídico en 20 µL de células rubidio-competentes (*E. coli* Origami™ 2(DE3) o *E. coli* BL21(DE3)) en un microtubo eppendorf de 1.5 ml en hielo donde se incubó por 25 a 30 minutos. Posteriormente se realizó un choque térmico de 45 segundos a 44 °C, al terminar se colocó nuevamente en hielo, pasados dos minutos se agregaron 800 µL de caldo LB.

Una vez agregado el caldo LB, se mezcló suavemente y se incubó 1 h a 37 °C en agitación a 200 rpm. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugaron los tubos a 13,000 rpm durante 2 minutos, se retiró el sobrenadante dejando aproximadamente de 50 a 100 µL de caldo LB. Se resuspendieron las células en dicho volumen y se transfirieron a placas de agar LB con Kanamicina a una concentración final de 30 µg/mL y se esparció por la placa por extensión con varilla. Se incubaron las placas durante 16 horas a 37 °C.

#### 4.2.2. Expresión a pequeña escala de las proteínas recombinantes

Se realizó una expresión para observar si las cepas transformadas eran capaces de producir nuestras proteínas y péptidos de interés.

Se seleccionaron 2 colonias por construcción, con la ayuda de un aplicador se transfirieron a un tubo que contenía 2 mL de caldo LB suplementado con Kanamicina a una concentración final de 30 µg/mL y tetraciclina a una concentración final de 12.5 µg/mL para *E. coli* Origami™ 2(DE3) y LB suplementado con Kanamicina a una concentración final de 30 µg/mL para *E. coli* BL21(DE3)), se incubaron a 37 °C durante 16 horas en agitación a 200 rpm. Después de las 16 horas se tomaron 20 µL del cultivo y se inocularon en un matraz de 250 ml conteniendo 20 ml de caldo LB con los antibióticos antes mencionados dependiendo de la cepa usada.

Estos matraces se incubaron a 37 °C con 200 rpm de agitación hasta alcanzar una D.O.<sub>600</sub> entre 0.4 – 0.6.

Una vez alcanzada la D.O.<sub>600</sub> entre 0.4 – 0.6 se detuvo la incubación y se atemperaron los cultivos, posteriormente se llevó a cabo la inducción utilizando

IPTG a una concentración final de 0.1 mM. Los cultivos se llevaron a incubación de 37 °C a 200 rpm de agitación por 16 horas, una vez que pasaron las 16 horas de incubación se recolectaron los sedimentos celulares centrifugando a 13,000 rpm durante 2 minutos y se descartó el sobrenadante.

#### 4.2.3. Lisis celular

Los sedimentos celulares obtenidos por centrifugación se resuspendieron en una solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM a pH 8.0, la lisis celular se logró utilizando un bead-beater y perlas de vidrio de 0.1 mm de diámetro. El lisado obtenido se centrifugó durante 10 minutos a 13,000 rpm y se separó el sobrenadante para su posterior análisis.

#### 4.2.4. Análisis del sobrenadante por SDS-PAGE

Para el caso de eritropoyteina y GM-CSF se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando un gel de resolución al 12%, un gel apilador al 4% y TGS como solución amortiguadora.

Una vez terminada la electroforesis se realizó la tinción con azul de Coomassie disuelto en metanol y ácido acético para observar las bandas correspondientes de las proteínas.

#### 4.2.5. Análisis del sobrenadante por Tricina SDS-PAGE

Para el caso de MP1106 y LL-37 se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando un gel de resolución al 12%, un gel apilador al 4% y una solución amortiguadora que contenía 25 mM Tris-HCl, 25 mM tricina, y 0.05% (p/v) SDS.

Una vez terminada la electroforesis se realizó la tinción con azul de Coomassie disuelto en ácido acético para observar las bandas correspondientes de las proteínas.

#### 4.2.6 Escalamiento usando 1 L de medio de cultivo.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las expresiones a pequeña escala se seleccionaron las colonias que presentaron la mayor producción de proteína, una por cada construcción, con la ayuda de un aplicador se transfirieron a un tubo que contenía 8 mL de caldo LB suplementado con los antibióticos correspondientes, posteriormente se incubaron a 37 °C durante 16 horas en agitación a 200 rpm.

Después de las 16 horas se tomaron 1 ml del cultivo y se inocularon en 8 matraces de 500 ml cada uno conteniendo 125 ml de medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes obteniendo un volumen final de 1 L.

Los matraces se incubaron a 37 °C con 200 rpm de agitación hasta alcanzar una D.O.<sub>600</sub> entre 0.4 – 0.6. Una vez alcanzado el D.O.<sub>600</sub> se detuvo la incubación y se atemperaron los cultivos, posteriormente se llevó a cabo la inducción utilizando IPTG a una concentración final de 0.1 mM.

Una vez inducidos, los cultivos se incubaron a 37 °C por 16 horas a 200 rpm de agitación, pasadas las 16 horas de incubación se recolectaron los sedimentos celulares centrifugando a 13,000 rpm durante 2 minutos y se descartó el sobrenadante.

#### 4.2.7 Lisis celular

Los sedimentos celulares obtenidos se resuspendieron en una solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM a pH 8.0 y fueron lisados de acuerdo con lo descrito en el punto 4.2.3.

### 4.3 Purificación de proteínas

#### 4.3.1 Tipos de técnicas empleadas para la purificación de las proteínas

A continuación, se describirán las dos técnicas que se usaron para la purificación.

##### 4.3.1.1 Cromatografía IMAC empleando la resina Profinity™ de Bio-Rad

Se tomaron 1.0 ml de la resina Profinity™ de Bio-Rad y se depositaron en un microtubo de 2 mL, la resina se centrifugó para retirar el líquido de almacenamiento y se lavó con 5 volúmenes de columna de agua mQ, se equilibró con 5 volúmenes de una solución amortiguadora que contenía 50 mM Tris-HCl y 500 mM NaCl pH 8.0 y se cargó la resina con 5 volúmenes de una solución de NiSO<sub>4</sub> al 0.1 M.

Una vez cargada la columna se lavó con 5 volúmenes de una solución amortiguadora que contenía 50 mM Tris-HCl y 500 mM NaCl pH 8.0 y después con 10 volúmenes de agua mQ. Se volvió a equilibrar la columna con 5 volúmenes de una solución amortiguadora que contenía 50 mM Tris-HCl y 500 mM NaCl pH 8.0 y se puso en contacto con la muestra obtenida de la diálisis por una hora.

Pasada la hora en contacto con la resina se lavó nuevamente con 5 volúmenes de una solución amortiguadora que contenía 50 mM Tris-HCl y 500



mM NaCl pH 8.0 colectándose los lavados. Se eluyó la proteína usando 5 volúmenes de una solución amortiguadora que contenía 200 mM de imidazol, 50 mM Tris-HCl y 500 mM NaCl pH 8.0, se colectaron las fracciones y por último se lavó la resina con 10 volúmenes de agua mQ y se dejó almacenada en etanol al 70%.

Todas las centrifugaciones que se llevaron a cabo en esta técnica fueron a 1,000 x g.

Para visualizar las fracciones obtenidas se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida. Una vez terminada la electroforesis se realizó la tinción con azul de Coomassie para observar las bandas correspondientes de las proteínas.

#### 4.3.1.2 Cromatografía IMAC empleando el sistema cromatográfico ÄKTA prime plus

Se utilizó una columna HisTrap HP de 1 mL (GE Healthcare) la cual fue cargada con 3 volúmenes de columna de NiSO<sub>4</sub> al 0.1 M. La columna se equilibró con 5 volúmenes de solución amortiguadora que contenía 50 mM Tris-HCl y 500 mM NaCl pH 8.0 utilizando un flujo de 0.5 ml/min y una presión máxima de 0.5 MPa.

La muestra se hizo pasar a través de la columna utilizando un flujo de 1.0 ml/min y una presión máxima de 0.5 MPa, recolectando la fase no unida.

Después que paso toda la muestra por la columna se lavó con 5 volúmenes de solución amortiguadora que contenía 50 mM Tris-HCl y 500 mM NaCl pH 8.0 hasta que la señal UV descendiera y se mantuviera constante.

Finalmente se llevó a cabo la elución utilizando un gradiente de concentración de 0 a 100% de una solución amortiguadora que contenía 200 mM imidazole 50 mM, Tris-HCl y 500 mM NaCl pH 8.0 usando un flujo de 0.5 mL/min y una presión máxima de 0.5 MPa recolectando fracciones de 0.5 mL.

Para visualizar las fracciones obtenidas se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida.

Una vez terminada la electroforesis se realizó la tinción con azul de Coomassie para observar las bandas correspondientes de las proteínas.

#### 4.3.2. Diálisis para la remoción de imidazol

De las fracciones obtenidas usando IMAC, se seleccionaron las que se observó que tenían mayor cantidad de proteína según lo indicado por la electroforesis en gel de poliacrilamida, a estas fracciones se les realizó una diálisis.

La mezcla de las fracciones se vertió dentro de una membrana de diálisis SnakeSkin Pleated (10K MWCO) y se puso en contacto con una solución amortiguadora que contenía 50 mM Tris-HCl y 500 mM NaCl pH 8.0 y con agitación. Se realizaron dos diálisis de una hora cada una y una más de 16 horas.

#### **4.4 Cuantificación de proteínas por el método Bradford**

Para la cuantificación de proteínas usando el método Bradford se utilizó BSA como estándar. Se realizó una curva de calibración a diferentes concentraciones del estándar (1.2 mg/mL, 1 mg/mL, 0.8 mg/mL, 0.6 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.2 mg/mL y 0.1 mg/mL). Se utilizaron 25  $\mu$ L, tanto del estándar como de

las muestras a analizar y se les adicionaron 200  $\mu$ L del reactivo de Bradford dejando incubar durante 5 minutos con agitación. Después de la incubación se llevó a cabo la medición de la absorbancia a 595 nm usando un espectrofotómetro (Jenway 7305). Las pruebas se realizaron por triplicado. Si alguna muestra se encontró fuera de la curva se le realizaron las diluciones pertinentes.

#### **4.5 Corte de la proteína de fusión**

La remoción de la proteína de fusión se realizó utilizando la enzima enteroquinasa, his, bovina (GenScript). Se tomó 1 mg de proteína y se le adicionaron 50 U de la enzima y se incubó por 24 horas a 25 °C.

#### **4.6 Evaluación de la actividad antimicrobiana de LL-37 y MP1106**

Se determinó la actividad antimicrobiana de LL-37 frente a *S. aureus* (ATCC 25923) y *E. coli* (ATCC 25922) y de MP1106 frente a *S. aureus* (ATCC 25923) utilizando el método *colony-forming unit* [52]. Se prepararon cultivos de *S. aureus* y *E. coli* a una concentración de  $10^6$  UFC/mL en solución amortiguadora de fosfato salino estéril (10 mM, pH 7,4). Se añadió SmbP\_LL-37, LL-37, SmbP\_MP1106, MP1106, kanamicina (todos a 50  $\mu$ M) o la solución amortiguadora control (Tris-HCl 50 mM y NaCl 500 mM, pH 8,0) a la suspensión bacteriana, y se incubó a 37 °C durante 3 h con agitación. Después de la incubación se diluyeron los cultivos bacterianos 1000 veces con solución amortiguadora de fosfato salino estéril, se transfirieron 0,1 mL de la dilución a placas de agar LB, se esparció por la placa por extensión con varilla y se incubó

durante 16 h para permitir el desarrollo de colonias. Finalizada la incubación, se contaron manualmente las colonias.

## CAPÍTULO 5

### 5. RESULTADOS

#### 5.1 Secuencias de eritropoyetina, GM-CSF, MP1106 y LL-37 optimizada para su expresión en *E. coli*

Las secuencias que codifican para la eritropoyetina, GM-CSF, MP1106 y LL-37 se enviaron a sintetizar a GenScript, Corporation con los sitios de corte de para las enzimas de restricción NcoI y XhoI.

CCATGGCT (NcoI)

```
CCG GCG CGT AGC CCG TCT CCG AGT ACC CAG CCG TGG GAA CAT GTT
AAC GCA ATT CAA GAA GCT CGT CGC CTG CTG AAT CTG TCT CGC GAT
ACC GCG GCC GAA ATG AAC GAA ACG GTG GAA GTT ATC TCC GAA ATG
TTT GAC CTG CAG GAA CCG ACC TGC CTG CAA ACG CGT CTG GAA CTG
TAT AAA CAG GGC CTG CGC GGT TCG CTG ACC AAA CTG AAA GGC CCG
CTG ACG ATG ATG GCG AGC CAT TAC AAA CAG CAT TGC CCG CCG ACC
CCG GAA ACG TCC TGT GCC ACC CAA ATC ATC ACG TTC GAA TCA TTC
AAA GAA AAC CTG AAA GAT TTT CTG CTG GTC ATT CCG TTC GAC TGT
TGG GAA CCG GTG CAG GAA TAA
```

CTCGAG (XhoI)

**Figura 4. Secuencia de GM-CSF optimizada para su expresión en *E. coli*.**

**A**

CCATGGCT (NcoI)

GCG CCG CCG CGT CTG ATC TGC GAC AGC CGT GTG CTG GAG CGT TAC  
 CTG CTG GAA GCG AAA GAG GCG GAA AAC ATC ACC ACC GGT TGC GCG  
 GAG CAC TGC AGC CTG AAC GAA AAC ATT ACC GTG CCG GAT ACC AAG  
 GTT AAC TTC TAT GCG TGG AAA CGT ATG GAA GTG GGT CAG CAA GCG  
 GTG GAA GTT TGG CAA GGT CTG GCG CTG CTG AGC GAG GCG GTG CTG  
 CGT GGT CAA GCG CTG CTG GTT AAC AGC AGC CAG CCG TGG GAA CCG  
 CTG CAA CTG CAC GTG GAC AAG GCG GTT AGC GGT CTG CGT AGC CTG  
 ACC ACC CTG CTG CGT GCG CTG GGT GCG CAG AAA GAG GCG ATC AGC  
 CCG CCG GAT GCG GCG AGC AGC GCG GCG CCG CTG CGT ACC ATT ACC  
 GCG GAT ACC TTC CGT AAA CTG TTT CGT GTG TAC AGC AAC TTT CTG  
 CGT GGC AAG CTG AAA CTG TAT ACC GGT GAA GCG TGC CGT ACC GGC  
 GAT CGT TAA

CTCGAG (XhoI)

**B**

CCATGGCT (NcoI)

GCG CCG CCG CGT CTG ATC TGC GAC AGC CGT GTG CTG GAG CGT TAC  
 CTG CTG GAA GCG AAA GAG GCG GAA AAA ATC ACC ACC GGT TGC GCG  
 GAG CAC TGC AGC CTG AAC GAA AAG ATT ACC GTG CCG GAT ACC AAG  
 GTT AAC TTC TAT GCG TGG AAG CGT ATG GAA GTG GGT CAG CAA GCG  
 GTG GAA GTT TGG CAA GGT CTG GCG CTG CTG AGC GAG GCG GTG CTG  
 CGT GGT CAA GCG CTG CTG GTT AAA AGC AGC CAG CCG TGG GAA CCG  
 CTG CAA CTG CAC GTG GAC AAG GCG GTT AGC GGT CTG CGT AGC CTG  
 ACC ACC CTG CTG CGT GCG CTG GGT GCG CAG AAA GAG GCG ATC AGC  
 CCG CCG GAT GCG GCG AGC AGC GCG GCG CCG CTG CGT ACC ATT ACC  
 GCG GAT ACC TTC CGT AAG CTG TTT CGT GTG TAC AGC AAC TTT CTG  
 CGT GGC AAG CTG AAA CTG TAT ACC GGT GAA GCG TGC CGT ACC GGC  
 GAT CGT TAA

CTCGAG (XhoI)

**Figura 5. Secuencias de la eritropoyetina optimizada para su expresión en *E. coli*. (A) WtEpo y (B) LysEpo**

CCATGGCT (NcoI)  
 GGT TTC GGC TGC AAC GGT CCG TGG AGC GAA AAG GAT ATG CAC TGC  
 CAC AAC CAC TGC AAG AGC ATC AAA GGT TAC AAG GGT GGC TAT TGC  
 GCG AAA GGT GGC TTT ATT TGC AAG TGC TAC TAA  
 CTCGAG (XhoI)

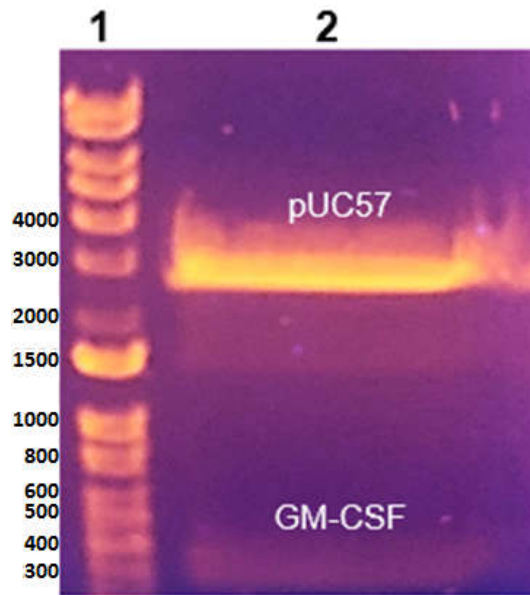
**Figura 6. Secuencia de MP1106 optimizada para su expresión en *E. coli*.**

CCATGGCT (NcoI)  
 CTG CTG GGC GAC TTC TTT CGT AAG AGC AAA GAG AAG ATT GGT AAA  
 GAG TTC AAG CGT ATC GTG CAA CGT ATT AAG GAT TTT CTG CGT AAC  
 CTG GTT CCG CGT ACC GAA AGC TAA  
 CTCGAG (XhoI)

**Figura 7. Secuencia de LL-37 optimizada para su expresión en *E. coli*.**

## 5.2 Digestión de los plásmidos

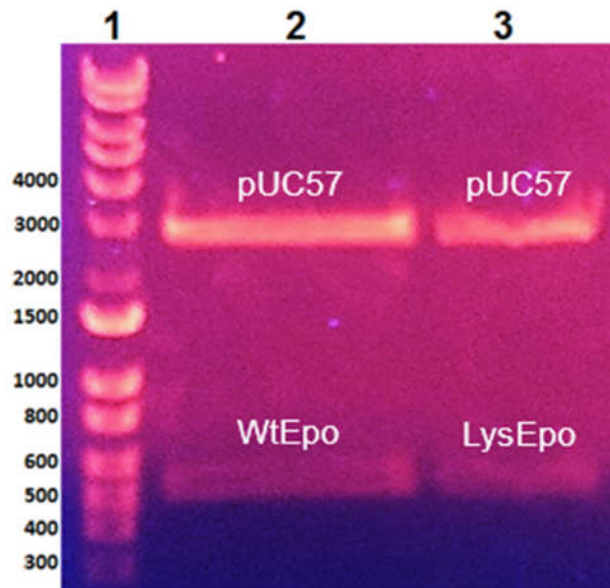
En la Figura 8 se muestra la electroforesis realizada después de digerir el plásmido pUC57\_GM-CSF con las enzimas de restricción NcoI y XhoI, en el carril 1 podemos observar el marcador de peso molecular, en el carril 2 se pueden apreciar dos bandas, la primera banda de aproximadamente 2700 pb pertenece al plásmido pUC57 mientras que la otra con 380 pb corresponde a la secuencia que codifica para la GM-CSF.



**Figura 8. Gel de agarosa al 0.7% de la digestión de pUC57\_GM-CSF.** Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Digestión del plásmido pUC57 (2700 pb) el cual contenía la secuencia de DNA que codifica para GM\_CSF (380 pb).

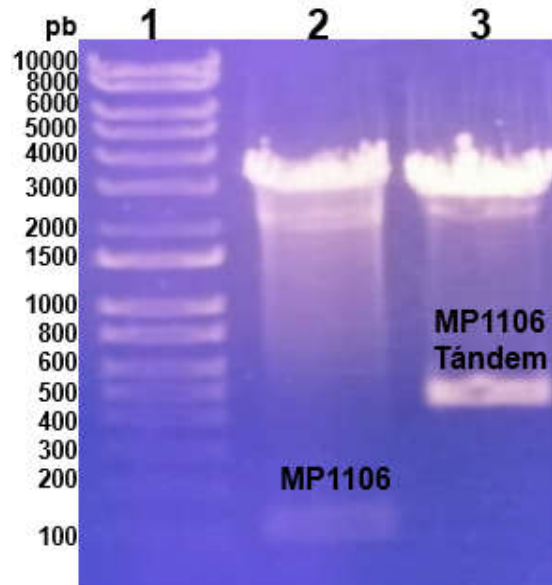
En la Figura 9 se muestra la electroforesis realizada después de digerir los plásmidos pUC57-WtEpo y pUC57-LysEpo con las enzimas de restricción NcoI y XhoI, en el carril 1 podemos observar el marcador de peso molecular, en el carril 2 se pueden apreciar dos bandas, la primera banda de aproximadamente 2700 pb pertenece al plásmido pUC57 mientras que la otra con 504 pb corresponde a pUC57-WtEpo y en el carril 3 también se pueden apreciar dos bandas, la primera banda de aproximadamente 2700 pb pertenece al plásmido pUC57 mientras que la otra con 504 pb corresponde a pUC57-LysEpo.





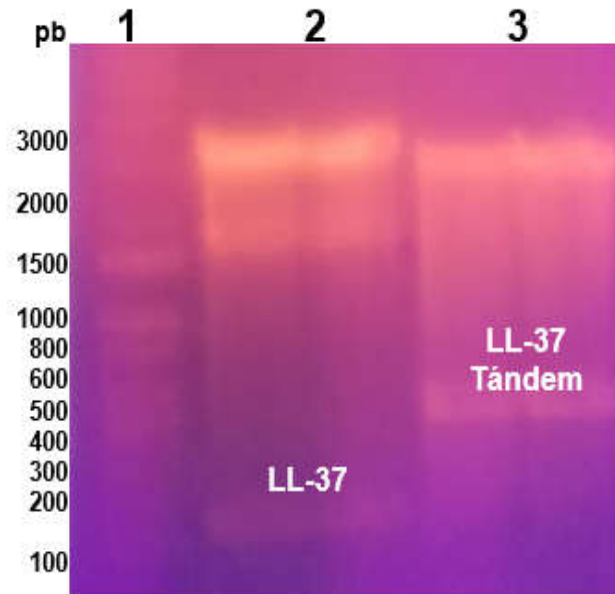
**Figura 9. Gel de agarosa al 0.7% de la digestión de pUC57-WtEpo y pUC57-LysEpo.** Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Digestión del plásmido pUC57 (2700 pb) el cual contenía la secuencia de DNA que codifica para WtEpo (504 pb) y Carril 3: Digestión del plásmido pUC57 (2700 pb) el cual contenía la secuencia de DNA que codifica para LysEpo (504 pb).

En la Figura 10 se muestra la electroforesis realizada después de digerir los plásmidos pUC57-MP1106 y pUC57-MP1106 tándem con las enzimas de restricción NcoI y XhoI, en el carril 1 podemos observar el marcador de peso molecular, en el carril 2 se pueden apreciar dos bandas, la primera banda de aproximadamente 2700 pb pertenece al plásmido pUC57 mientras que la otra con 120 pb corresponde a la secuencia que codifica para el MP1106, en el carril 3 también se pueden observar dos bandas, la primera banda que pertenece al pUC57 y la segunda con un peso aproximado de 450 pb correspondiente al MP1106 tándem.



**Figura 10. Gel de agarosa al 0.7% de la digestión de pUC57-MP1106 y pUC57-MP1106 Tándem.** Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Digestión del plásmido pUC57 (2700 pb) el cual contenía la secuencia de DNA que codifica para MP1106 (120 pb) y Carril 3: Digestión del plásmido pUC57 (2700 pb) el cual contenía la secuencia de DNA que codifica para MP1106 Tándem (450 pb).

En la Figura 11 se muestra la electroforesis realizada después de digerir los plásmidos pUC57\_LL-37 y pUC57\_LL-37 tándem con las enzimas de restricción NcoI y XhoI, en el carril 1 podemos observar el marcador de peso molecular, en el carril 2 se pueden apreciar dos bandas, la primera banda de aproximadamente 2700 pb pertenece al plásmido pUC57 mientras que la otra con 111 pb corresponde a pUC57\_LL-37 y en el carril 3 de igual forma se pueden apreciar dos bandas, la primera banda de aproximadamente 2700 pb pertenece al plásmido pUC57 mientras que la otra con 423 pb corresponde a pUC57\_LL-37 tándem.



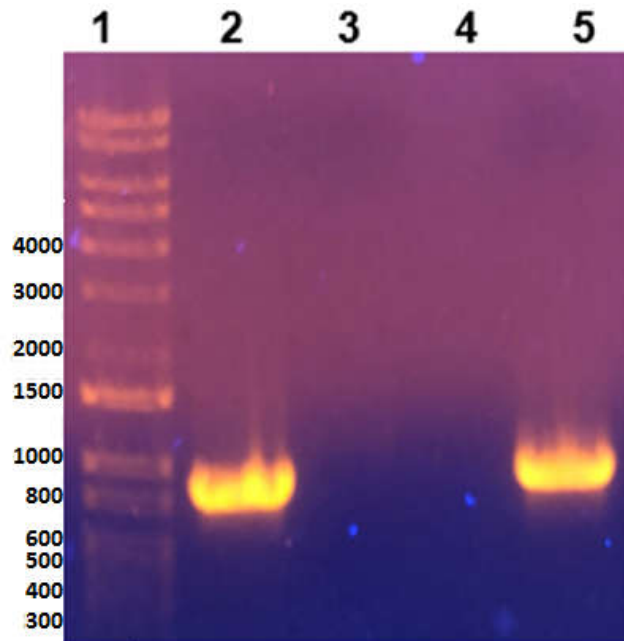
**Figura 11. Gel de agarosa al 0.7% de la digestión de pUC57\_LL-37 y pUC57\_LL-37 Tándem.** Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Digestión del plásmido pUC57 (2700 pb) el cual contenía la secuencia de DNA que codifica para LL-37 (111 pb) y Carril 3: Digestión del plásmido pUC57 (2700 pb) el cual contenía la secuencia de DNA que codifica para LL-37 Tándem (423 pb).

### 5.3 Construcción de los plásmidos

Una vez obtenidos nuestros genes de interés se realizó la ligación del plásmido pET30a-SmbP y pET30a-CusF3H+ con los insertos, se realizó una amplificación por PCR utilizando los iniciadores delantero y reverso T7 para confirmar las construcciones.

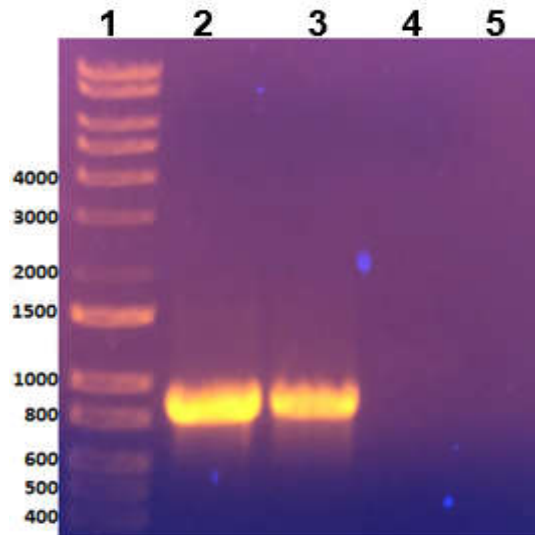
#### 5.3.1 Construcción de pET30a-SmbP-GM\_CSF y pET30a-CusF3H+-GM\_CSF

A continuación, se muestra la amplificación de pET30a-SmbP-GM\_CSF (Figura 12), en el carril 2 y 5 se puede observar una banda entre los 800 y 900 pb, estas bandas concuerdan con el peso esperado de la construcción (944 pb).



**Figura 12. Gel de agarosa al 0.7% de la amplificación de pET30a-SmbP\_GM-CSF.** Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2 y 5: Construcción SmbP\_GM-CSF (944 pb), Carril 3: Control negativo (sin ADN molde) y Carril 4: Control Negativo.

En el siguiente gel de agarosa (Figura 13) se muestra la amplificación de pET30a-CusF3H+\_GM-CSF, en el carril 2 y 3 se puede observar una banda entre los 800 y 900 pb, esto concuerda con el peso esperado de la construcción (934 pb).

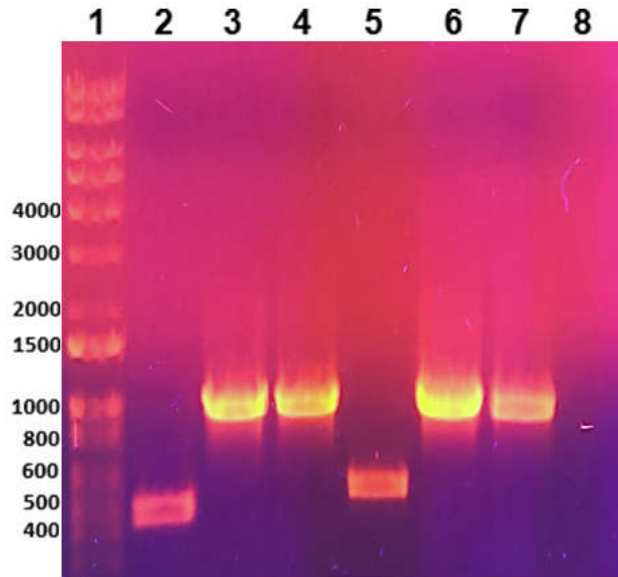


**Figura 13. Gel de agarosa al 0.7% de la amplificación de CusF3H+\_GM-CSF.** Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2 y 3: Construcción CusF3H+\_GM-CSF (934 pb), Carril 4: Control negativo (sin ADN molde) y Carril 5: Control Negativo.

### 5.3.2 Construcción de pET30a-SmbP\_WtEpo, pET30a-CusF3H+\_WtEpo, pET30a-SmbP\_LysEpo, pET30a-CusF3H+\_LysEpo

En el siguiente gel de agarosa (Figura 14) se puede observar las amplificaciones de las cuatro construcciones de la eritropoyetina, en el Carril 3 la construcción pET30a-SmbP\_WtEpo (1018 pb), en el Carril 4 pET30a-SmbP\_LysEpo (1009 pb), en el Carril 6 pET30a-CusF3H+\_WtEpo (1018 pb) y en el Carril 7 pET30a-CusF3H+\_LysEpo (1009 pb), las cuatro bandas obtenidas se encuentran ligeramente encima de la banda de 1000 pb al compararse con el marcador de peso molecular. Se agregaron 2 controles donde el plásmido no contaba con el gen de interés, esto para observar con mayor facilidad la diferencia de pesos entre el plásmido y la construcción final.

En el Carril 2 está el control pET30-SmbP y en el Carril 5 pET30a-CusF3H+.

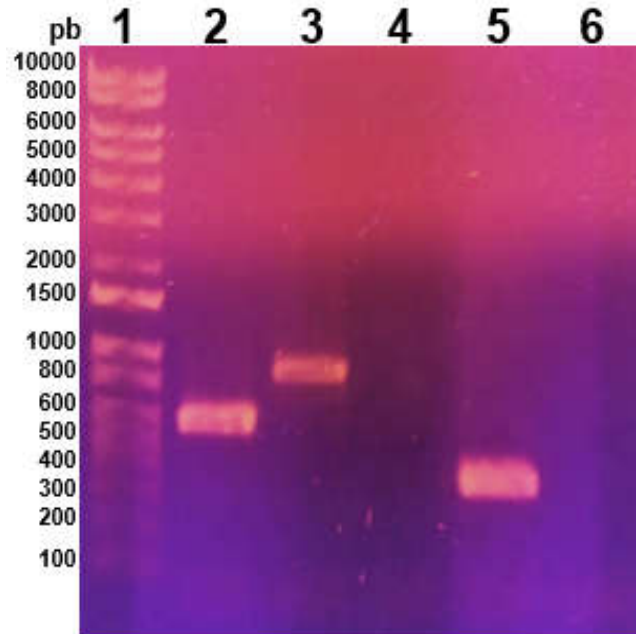


**Figura 14. Gel de agarosa al 0.7% de las construcciones de Epo.** Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Control SmbP\_Stop (514 pb), Carril 3: Construcción SmbP\_WtEpo (1018), Carril 4: Construcción SmbP\_LysEpo (1018 pb), Carril 5: Control CusF3H+\_Stop (505), Carril 6: Construcción CusF3H+\_WtEpo (1009 pb), Carril 7: Construcción CusF3H+\_LysEpo (1009) y Carril 8: Control negativo (sin ADN molde).

### 5.3.3 Construcción de los plásmidos para la expresión de MP1106 y MP1106 tándem

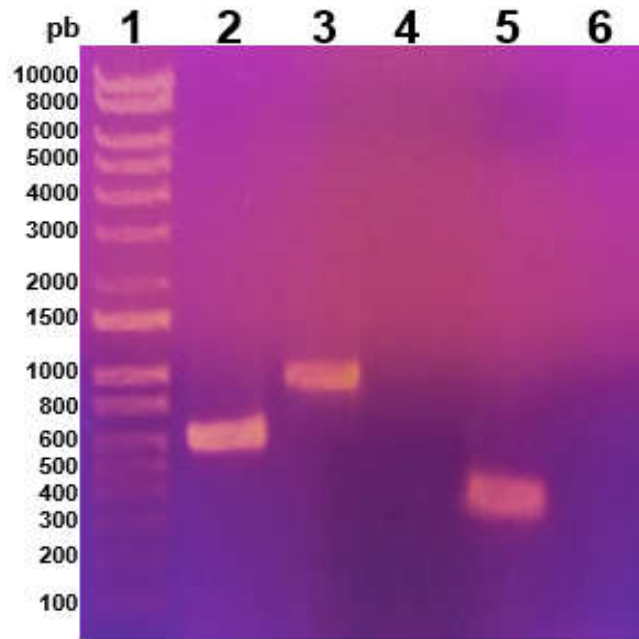
El siguiente gel muestra la amplificación de pET30a-CusF3H+\_MP1106 y pET30a-CusF3H+\_MP1106 tándem (Figura 15), en el carril 2 se puede observar una banda alrededor de los 600 pb, esta banda concuerda con el peso esperado de pET30a-CusF3H+\_MP1106 (589 pb), en el carril 3 se puede observar la banda perteneciente a la construcción pET30a-CusF3H+\_MP1106 tándem con un peso aproximado de 972 pb, en los carriles 4 y 6 están los controles negativos y en el carril 5 se puede observar la banda perteneciente a la amplificación del plásmido pET30a sin ninguna modificación el cual tiene un peso aproximado de 367 pb,

esto, para observar con mayor facilidad la diferencia de pesos entre el plásmido y la construcción final.



**Figura 15. Gel de agarosa al 0.7% de la amplificación de pET30a-CusF3H+\_ MP1106 y pET30a-CusF3H+\_MP1106 tándem.** Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Construcción pET30a-CusF3H+\_MP1106 (589 pb), Carril 3: Construcción pET30a-CusF3H+\_MP1106 Tándem (972 Pb), Carril 4: Control negativo (sin ADN molde), Carril 5: Control pET30a (367 pb) y Carril 6: Control negativo (sin polimerasa).

En el siguiente gel de agarosa (Figura 16) se muestra la amplificación de pET30a-SmbP-MP1106 y pET30a-SmbP\_MP1106 tándem, en el carril 2 se puede ver la banda que corresponde a pET30a\_SmbP-MP1106 con un peso aproximado 598 pb, en el carril 3 se puede apreciar una banda alrededor de los 1000pb esto concuerda con el peso esperado de pET30a-SmbP\_MP1106 tándem (981 pb).

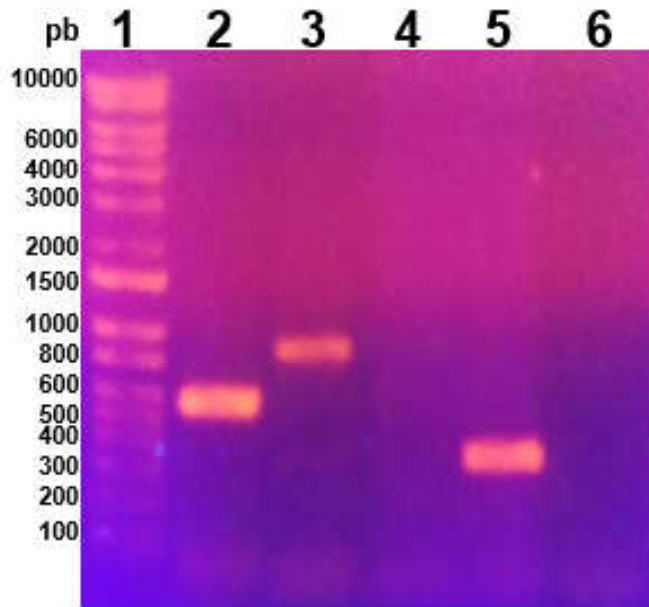


**Figura 16. Gel de agarosa al 0.7% de la amplificación de pET30a-SmbP\_MP1106 y pET30a-SmbP\_MP1106 Tándem.** Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Construcción pET30a-SmbP\_MP1106 (598 pb), Carril 3: Construcción pET30a-SmbP\_MP1106 Tándem (981 Pb), Carril 4: Control negativo (sin ADN molde), Carril 5: Control pET30a (367 pb) y Carril 6: Control negativo (sin polimerasa).

#### 5.3.4 Construcción de los plásmidos para la expresión de LL-37 y LL-37 tándem

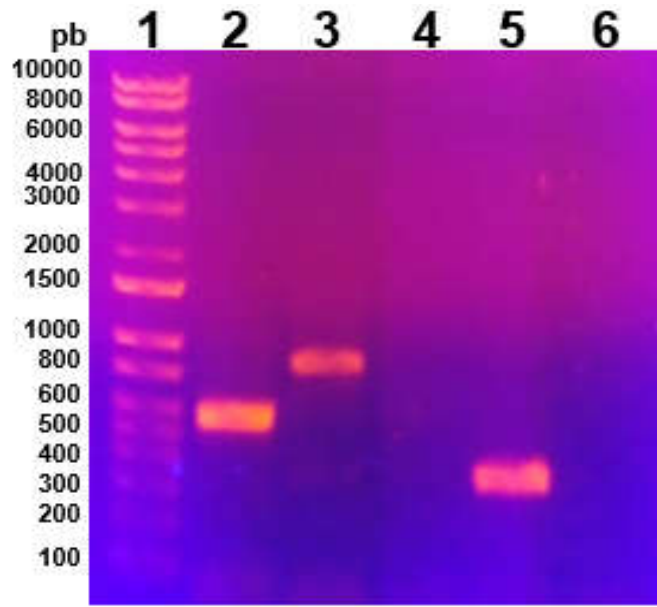
En el siguiente gel de agarosa (Figura 17) se pueden observar las amplificaciones de las construcciones LL-37 y LL-37 tándem usando CusF3H+ como proteína de fusión, en el Carril 3 la construcción pET30a-CusF3H+\_LL-37 (580 pb) y en el Carril 3 pET30a-CusF3H+\_LL-37 tándem (945 pb), de igual forma se agregaron en los carriles 4, 5 y 6 los controles correspondientes.





**Figura 17. Gel de agarosa al 0.7% de la amplificación de pET30a-CusF3H+\_LL-37 y pET30a-CusF3H+\_LL-37 Tándem.** Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Construcción pET30a-CusF3H+\_LL-37 (580 pb), Carril 3: Construcción pET30a-CusF3H+\_LL-37 Tándem (945 Pb), Carril 4: Control negativo (sin ADN molde), Carril 5: Control pET30a (367 pb) y Carril 6: Control negativo (sin polimerasa).

En la Figura 18 se pueden observar las amplificaciones de las construcciones LL-37 y LL-37 tándem esta vez usando SmbP como proteína de fusión, en el Carril 3 se puede observar la banda de la construcción pET30a-SmbP\_LL-37 (589 pb) y en el Carril 3 la banda de pET30a-SmbP\_LL-37 tándem (954 pb) y en los carriles 4, 5 y 6 los controles correspondientes.

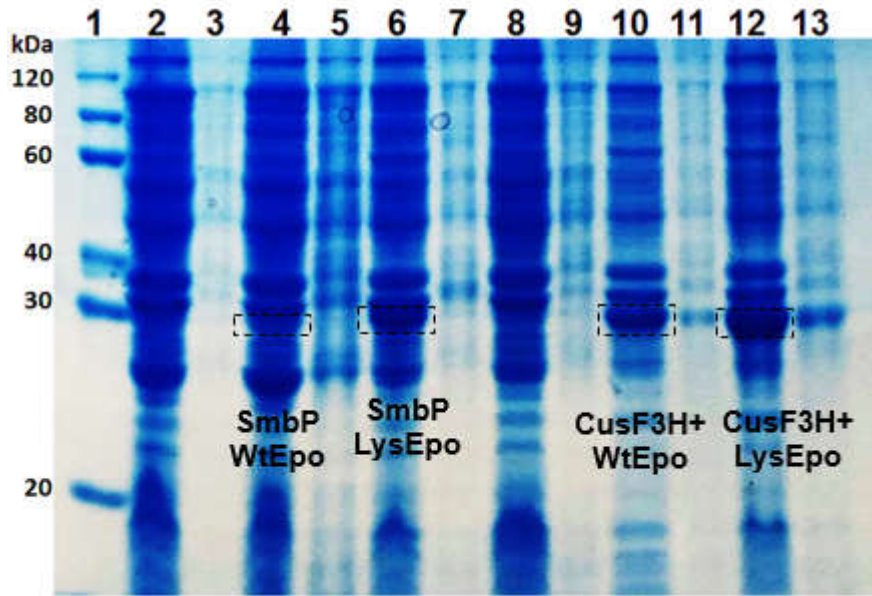


**Figura 18. Gel de agarosa al 0.7% de la amplificación de pET30a-SmbP\_LL-37 y pET30a-SmbP\_LL-37 Tándem.** Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Construcción pET30a-SmbP\_LL-37 589 pb), Carril 3: Construcción pET30a-SmbP\_LL-37 Tándem (954 Pb), Carril 4: Control negativo (sin ADN molde), Carril 5: Control pET30a (367 pb) y Carril 6: Control negativo (sin polimerasa).

## 5.4 Expresiones a pequeña escala

5.4.1 Expresión a pequeña escala de pET30a-SmbP\_WtEpo, pET30a-CusF3H+\_WtEpo, pET30a-SmbP\_LysEpo, pET30a-CusF3H+\_LysEpo.

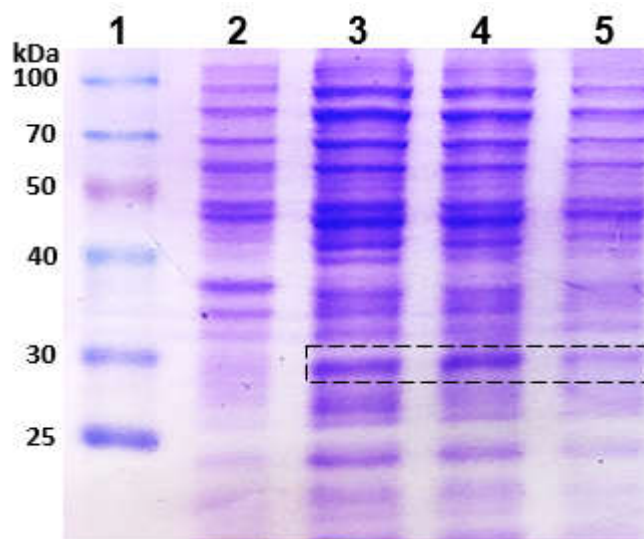
Se corrió un SDS-PAGE (Figura 19) para verificar si la proteína se producía. Los Carriles 2 y 3 pertenecen a pET30a-SmbP y los Carriles 8 y 9 a pET30a-CusF3H+, se usaron estos controles con la finalidad de observar si la banda obtenida al momento de la expresión era propia de *E. coli* o era nuestra proteína de interés. En los Carriles 4,6,8 y 10 se puede observar una banda alrededor de los 30 kDa, lo cual coincide con el peso esperado de la eritropoyetina.



**Figura 19. Expresión a pequeña escala de Epo.** Carril 1: Marcador de peso molecular, Carriles 2,3: Control SmbP\_Stop, Carriles 4 y 5: SmbP\_WtEpo, Carriles 6 y 7: SmbP\_LysEpo, Carriles 8 y 9: Control CusF3H+\_Stop, Carriles 10 y 11: CusF3H+\_WtEpo y Carriles 12 y 13: CusF3H+\_LysEpo.

#### 5.4.2 Expresión a pequeña escala de pET30a-PelB-SmbP-GM\_CSF

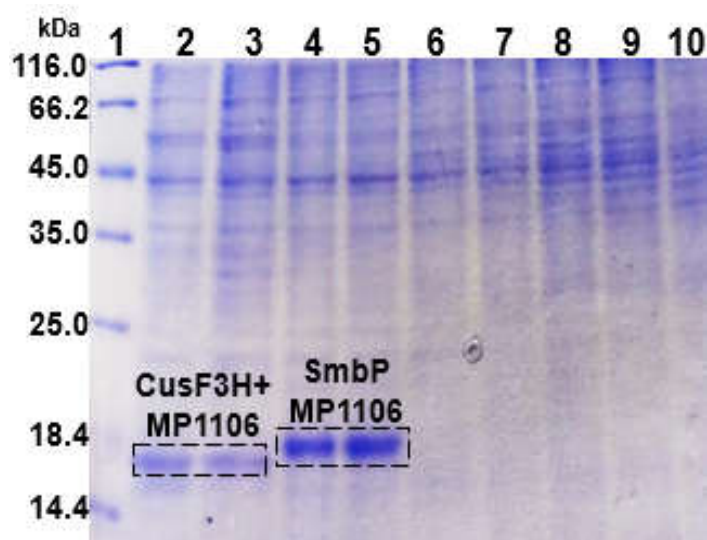
Se corrió un SDS-PAGE (ver Figura 20) para verificar si el GM-CSF se producía. El Carriles 2 es una expresión control, se realizó con la finalidad de observar si la banda obtenida al momento de la expresión era una banda propia de *E. coli*. En los Carriles 3,4,5 se puede observar una banda alrededor de los 29 kDa, lo cual coincide con el peso esperado de GM-CSF.



**Figura 20. Expresión piloto de GM-CSF.** Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Control y Carriles 3, 4 y 5: PelB-SmbP-GM\_CSF.

#### 5.4.3 Expresiones a pequeña escala de SmbP/CusF3H+ MP1106 y SmbP/CusF3H+ MP1106 tándem

Se corrió un Tricina SDS-PAGE (ver Figura 21) para verificar si las proteínas se producían. Los Carriles 2 y 3 pertenecen a CusF3H+-MP1106 y los Carriles 4 y 5 SmbP-MP1106, en estos 4 carriles se puede observar una banda alrededor de los 15 kDa la cual coincide con el peso esperado de las dos construcciones (15.5 kDa). Los carriles 5, 6, 7, y 8 pertenecen a las construcciones en tándems, en este caso no se puede observar la banda que debería estar alrededor de los 27.5 kDa y el carril 10 pertenece al control.

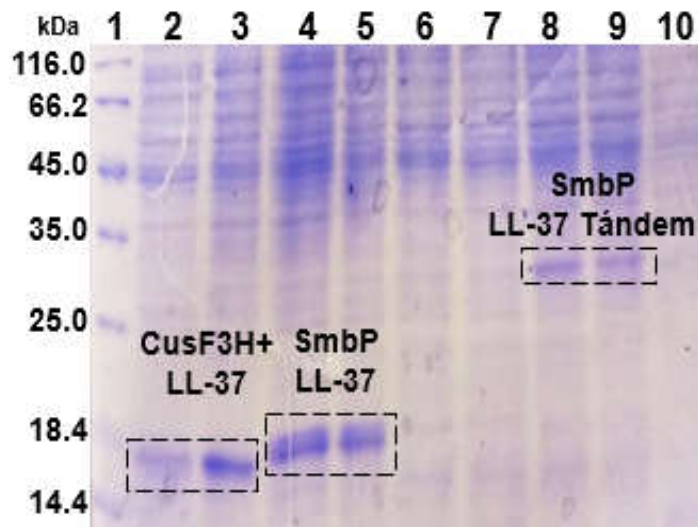


**Figura 21. SDS-PAGE al 12% de la expresión piloto de MP1106 y MP1106 Tándem.** Carril 1: Marcador de peso molecular, Carriles 2 y 3: CusF3H+-MP1106 (15.5 kDa), Carriles 4 y 5: SmbP-MP1106 (15.5 kDa), Carriles 6 y 7: CusF3H+-MP1106 Tándem (27.5 kDa), Carriles 8 y 9: SmbP-MP1106 Tándem (27.5 kDa) y Carril 10: Control.

#### 5.4.4 Expresiones a pequeña escala de SmbP/CusF3H+ LL-37 y SmbP/CusF3H+ LL-37 tándem

Se corrió un SDS-PAGE (ver Figura 22) para verificar si las proteínas se producían. El Carriles 10 es una expresión control, se realizó con la finalidad de observar si la banda obtenida al momento de la expresión era una banda propia de *E. coli*. En los Carriles 2 y 3, se puede observar una banda alrededor de los 15 kDa perteneciente a CusF3H+-LL-37, en los carriles 4 y 5 también se puede observar una banda alrededor de los 15 kDa perteneciente a SmbP\_LL-37, estas bandas coinciden con el peso esperado el cual de aproximadamente 15.5 kDa tanto para CusF3H+-LL-37 como para SmbP\_LL-37. De las construcciones en tándem solo se pueden apreciar bandas en los carriles 8 y 9 las cuales pertenecen a la construcción usando SmbP como proteína de fusión, las bandas

que se observan coinciden con el peso aproximado el cual es de 27.5 kDa aproximadamente.



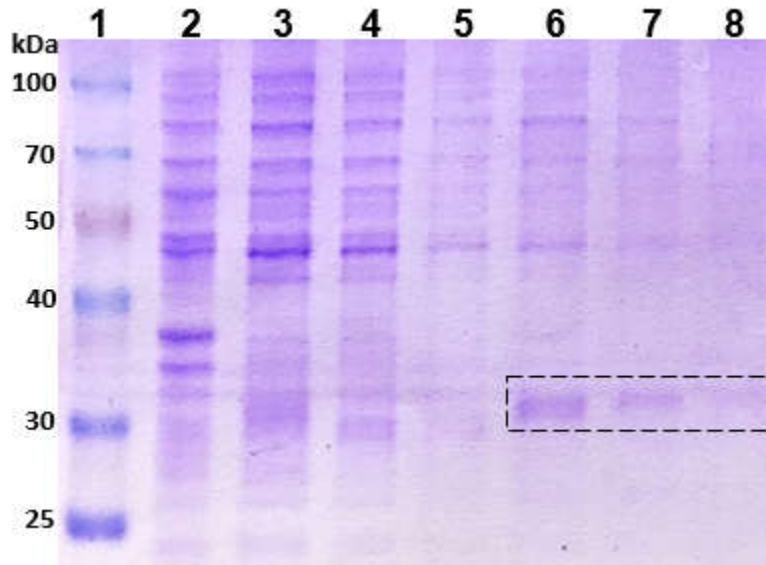
**Figura 22. SDS-PAGE al 12% de la expresión piloto de LL-37 y LL-37 Tandem.** Carril 1: Marcador de peso molecular, Carriles 2 y 3: CusF3H+ LL-37 (15.5 kDa), Carriles 4 y 5: SmbP LL-37 (15.5 kDa), Carriles 6 y 7: CusF3H+ LL-37 Tandem (27.5 kDa), Carriles 8 y 9: SmbP LL-37 Tandem (27.5 kDa) y Carril 10: Control.

## 5.5 Expresiones a 1 L de medio de cultivo

### 5.5.1 Expresión de GM-CSF a 1 L de medio de cultivo y purificación mediante la resina Profinity™

Se realizó el escalamiento de acuerdo con el método descrito en el punto 4.2.6, una vez producida la proteína se extrajo mediante el método descrito en el punto 4.2.3., la purificación se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito en el punto 4.3.1.2. Después de la purificación se realizó un SDS-PAGE al 12 % para poder visualizar las fracciones obtenidas.

En la figura 23 los carriles 6-8 podemos observar las fracciones de elución.

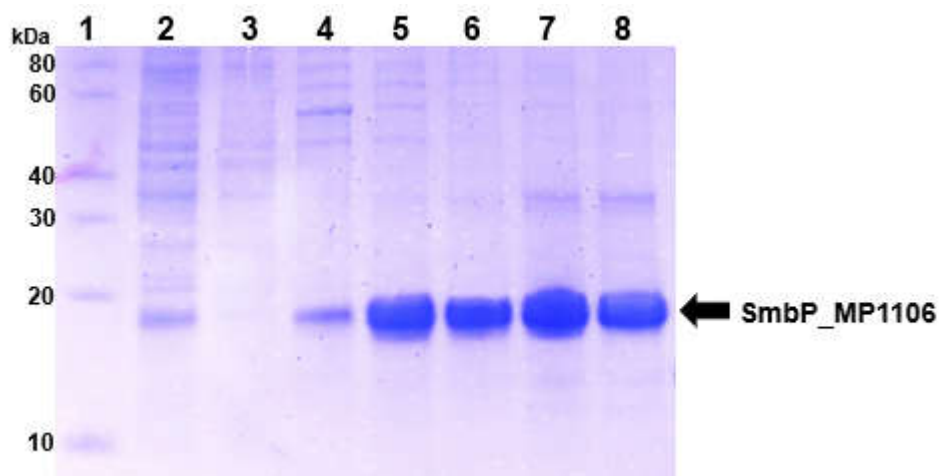


**Figura 23. SDS-PAGE al 12% de la purificación de PeIB-SmbP-GM\_CSF mediante cromatografía de afinidad.** Carril 1: marcador de peso molecular, Carril 2: Control, Carril 3: PeIB-SmbP-GM\_CSF sin purificar, Carril 4: Fracción no unida, Carril 5: fracción de Lavado y Carril 6, 7 y 8: fracciones de elución.

#### 5.5.2 Expresión de SmbP\_MP1106 a 1 L de medio de cultivo y purificación mediante IMAC empleando el sistema cromatográfico ÄKTA prime plus

Se realizó el escalamiento de acuerdo con el método descrito en el punto 4.2.6, una vez producido el péptido se extrajo mediante el método descrito en el punto 4.2.3., la purificación se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito en el punto 4.3.1.2. Después de la purificación se realizó un Tricina SDS-PAGE al 13.5 % para poder visualizar las fracciones obtenidas.

En la figura 24 los carriles 4-8 podemos observar las fracciones de elución.



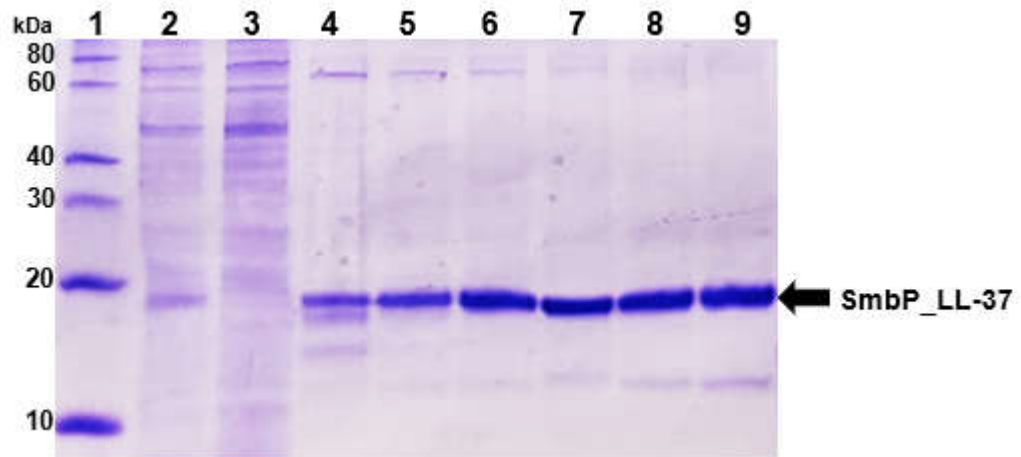
**Figura 24. Tricina SDS-PAGE al 13.5% de la purificación de SmbP\_MP1106.** Carril 1: Marcador de peso molecular, Carriles 2: SmbP\_MP1106 antes de la purificación, Carriles 3: Fracción no unida y Carriles 4-8: Fracciones de elución.

### 5.5.3 Expresión de SmbP\_LL-37 a 1 L de medio de cultivo y purificación mediante IMAC empleando el sistema cromatográfico ÄKTA prime plus

Se realizó el escalamiento de acuerdo con el método descrito en el punto 4.2.6, una vez producido el péptido se extrajo mediante el método descrito en el punto 4.2.3., la purificación se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito en el punto 4.3.1.2. Después de la purificación se realizó un Tricina SDS-PAGE al 13.5 % para poder visualizar las fracciones obtenidas.

En la figura 25 los carriles 4-9 podemos observar las fracciones de elución.





**Figura 25. Tricina SDS-PAGE al 13.5% de la purificación de SmbP\_LL-37.** Carril 1: Marcador de peso molecular, Carriles 2: SmbP\_LL-37 antes de la purificación, Carriles 3: Fracción no unida y Carriles 4-9: Fracciones de elución.

## 5.6 Cuantificación de proteínas por el método Bradford

La cuantificación de los péptidos antimicrobianos se realizó de acuerdo con el método descrito en el punto 4.4. La Tabla 2 muestra las absorbancias obtenidas de la curva de calibración. Las absorbancias se graficaron (ver Figura 26) para obtener la ecuación de la recta.

**Tabla 2. Datos de la curva de calibración para el método Bradford.**

	Concentración de estándares (mg/ml)	Volumen de muestra (µL)	Reactivo de Bradford (mL)	Absorbancia promedio a 595 nm
Estándar 1	1.2	25	1	1.061
Estándar 2	1.0	25	1	0.905
Estándar 3	0.8	25	1	0.745
Estándar 4	0.6	25	1	0.584
Estándar 5	0.4	25	1	0.375
Estándar 6	0.2	25	1	0.220

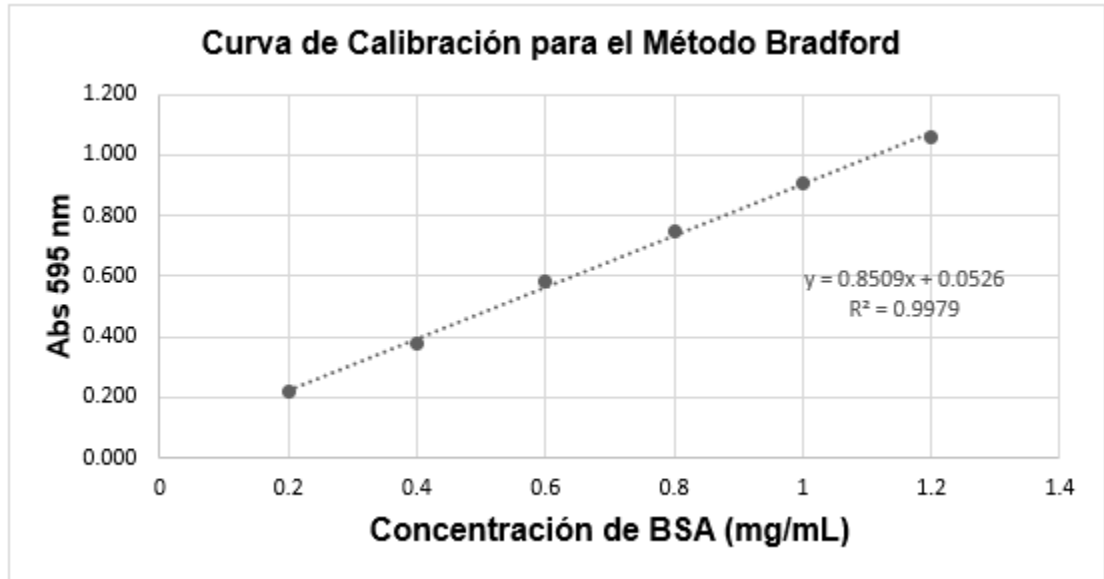


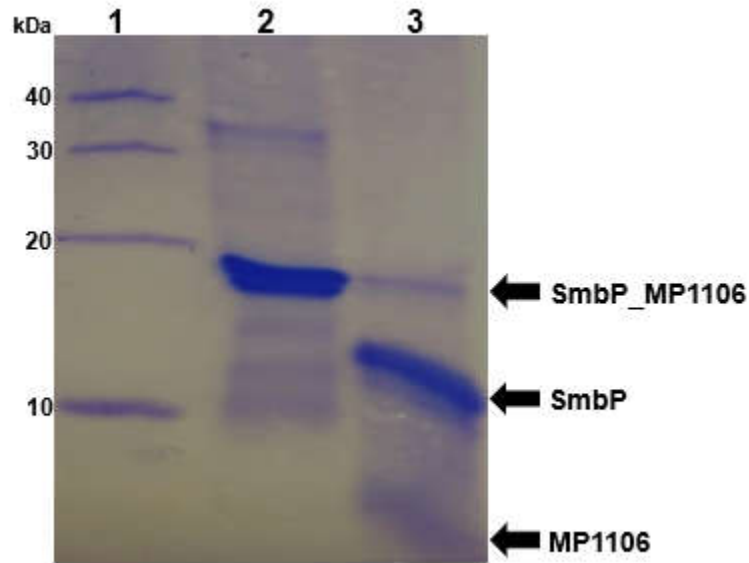
Figura 26. Gráfica de la curva de calibración del método de Bradford a 595 nm.

Utilizando la ecuación de la recta y la absorbancia de las muestras, se cuantifico la concentración de SmbP\_MP1106 y SmbP\_LL-37.

En el caso de SmbP\_MP1106 la concentración final fue de 3.6 mg por litro de cultivo, para SmbP\_LL-37 la concentración final fue de 4.7 mg por litro de cultivo.

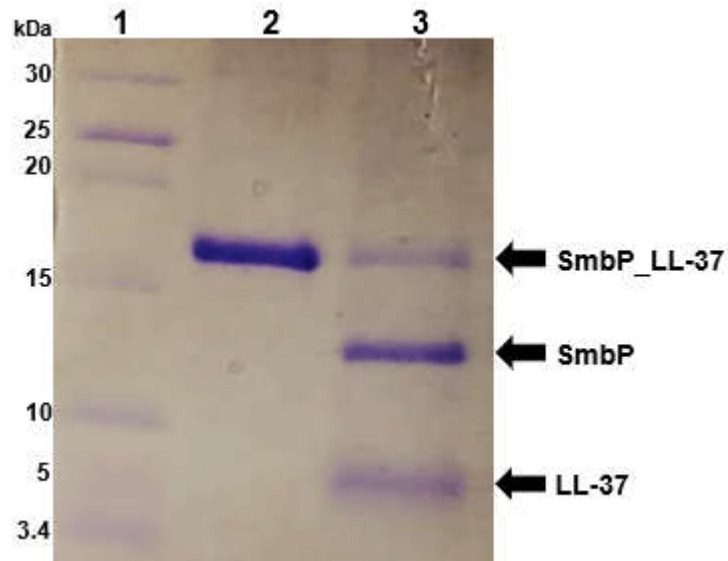
### 5.7 Corte de la proteína de fusión

Una vez cortada la proteína de fusión de acuerdo con el método descrito en el punto 4.5 se hicieron geles de Tricina SDS\_PAGE para visualizar el corte. En la Figura 27 carril 2 se observa SmbP\_MP1106 antes de ser cortado por la enteroquinasa, en el carril 3 se pueden apreciar tres bandas. Alrededor de los 15 kDa se puede ver SmbP\_MP1106 no cortada, alrededor de los 10 kDa SmbP y por último MP1106 alrededor de los 5 kDa.



**Figura 27. Tricina SDS-PAGE al 15% de SmbP\_MP1106 después del corte con enteroquinasa.** Carril 1: marcador de peso molecular, Carril 2: SmbP\_MP1106 purificado por IMAC, Carril 3: SmbP\_MP1106 después del corte con enteroquinasa.

En la Figura 28 carril 2 se observa SmbP\_LL-37 antes del corte con enteroquinasa, en el carril 3 se pueden apreciar tres bandas. Alrededor de los 15 kDa se puede apreciar SmbP\_LL-37 que no fue cortada, alrededor de los 10 kDa SmbP y por último LL-37 alrededor de los 5 kDa.

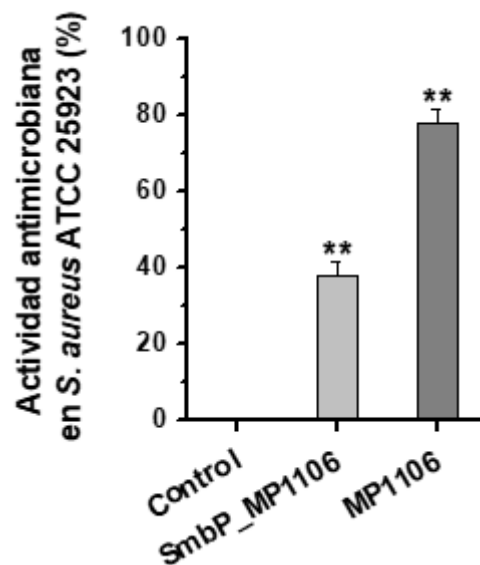


**Figura 28. Tricina SDS-PAGE al 15% de SmbP\_LL-37 después del corte con enteroquinasa.** Carril 1: marcador de peso molecular, Carril 2: SmbP\_LL-37 purificado por IMAC, Carril 3: SmbP\_LL-37 después del corte con enteroquinasa.

## 5.8 Evaluación de la actividad antimicrobiana de MP1106 y LL-37

Después de la digestión con enteroquinasa. Se evaluó la actividad antimicrobiana de acuerdo con el método descrito en el punto 4.6. La actividad antimicrobiana se expresó como el porcentaje de la población bacteriana inhibida después de la incubación.

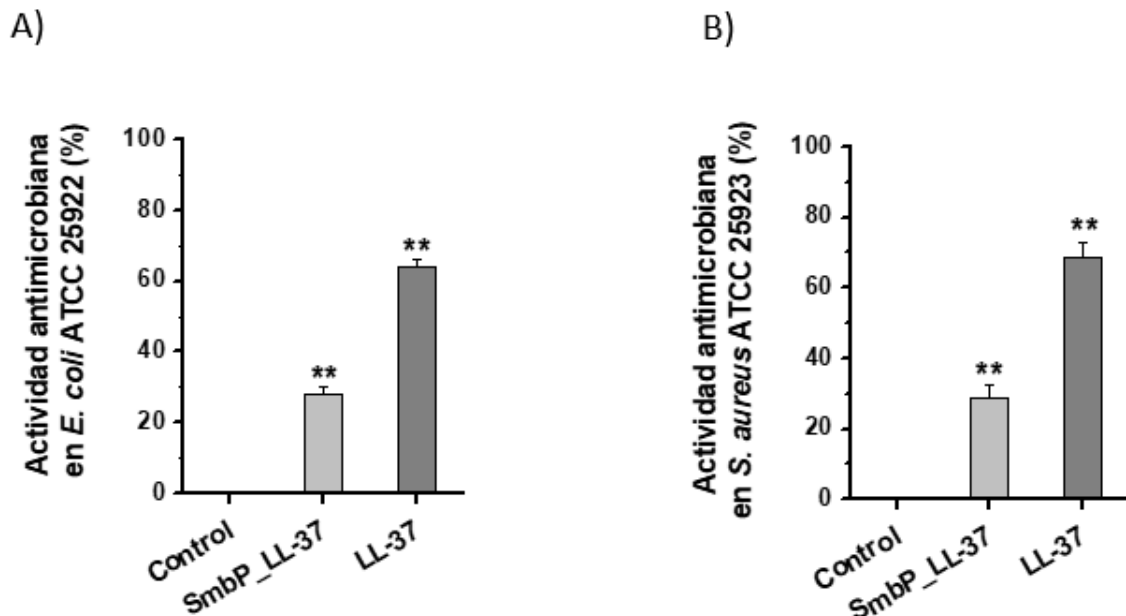
Como se puede observar en la Figura 29 SmbP\_MP1106 muestra actividad antimicrobiana contra *S. aureus* (ATCC 25923). SmbP\_MP1106 disminuyo el crecimiento de *S. aureus* en ~38 %. Después del corte con enteroquinasa la actividad aumento de forma significativa llegando hasta un ~78%.



**Figura 29. Actividad antimicrobiana de SmbP\_MP1106 y MP1106 libre usando el método CFU.** La actividad antimicrobiana fue probada en *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Una solución amortiguadora de 50 mM Tris-HCl and 500 mM NaCl fue usada como control negativo. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (\*\*,  $p < 0,05$  según la prueba  $t$  de Student) en comparación con el control.

SmbP\_LL-37 muestra la actividad antimicrobiana contra ambas bacterias: *E. coli* (ATCC 25922) y *S. aureus* (ATCC 25923). Como se ve en la Figura 30 SmbP\_LL-37 fue capaz de disminuir el crecimiento de *E. coli* en un ~28% y el de

*S. aureus* en un ~29%. Después del corte con enteroquinasa LL-37 fue capaz de disminuir el crecimiento de *E. coli* en un ~64% con un resultado ligeramente mayor para *S. aureus* (~69%).



**Figura 30. Actividad antimicrobiana de SmbP\_LL-37 y LL-37 libre usando el método CFU.** La actividad antimicrobiana fue probada contra A) *Escherichia coli* ATCC 25922 y B) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Una solución amortiguadora de 50 mM Tris-HCl y 500 mM NaCl fue usada como control negativo. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (\*\*,  $p < 0,05$  según la prueba *t* de Student) en comparación con el control.

## CAPÍTULO 6

### 6. Discusiones

#### 6.1 Discusión de resultados

En el presente trabajo se realizaron catorce construcciones para la expresión de dos péptidos (MP1106 y LL-37) y dos proteínas de interés farmacéutico (eritropoyetina y GM-CSF) usando como hospedero *E. coli*.

Las secuencias que codifican para nuestros péptidos y proteínas de interés fueron optimizada y sintetizada para su expresión en *E. coli*.

La optimización de las secuencias es un paso muy importante, normalmente las secuencias nativas poseen codones que no son usados regularmente por nuestro hospedero llamados codones raros. Estos codones al estar presentes en nuestra secuencia pueden alterar el proceso de traducción disminuyendo la producción de proteína. La optimización reemplaza estos codones raros por codones que nuestro hospedero use normalmente, esto evita errores en la traducción y por lo tanto aumenta la cantidad de proteína producida [53].

Nuestras proteínas y péptidos serán producidas en el citoplasma de *E. coli* ya que se ha observado que la producción aquí tiene mejores rendimientos, sin embargo, *E. coli* es incapaz de catalizar la formación de enlaces disulfuro en el citoplasma ya que este no posee el ambiente adecuado, los puentes disulfuro son necesarios para que el péptido MP1106 y la eritropoyetina se produzcan solubles y activos, por esta razón se usó la cepa *E. coli* Origami 2 (DE3) para su expresión, esta cepa posee mutaciones en los genes de la tiorredoxina reductasa (*trxB*) y glutatión reductasa (*gor*). Estas mutaciones permiten que tiorredoxinas y glutaredoxinas se encuentren en su forma oxidada en el citoplasma y puedan ayudar a catalizar la formación de enlaces disulfuro [54].

Como ya se había mencionado con anterioridad una de las principales desventajas de producir proteínas y péptidos es el bajo rendimiento y el costoso proceso de purificación, además, la formación de cuerpos de inclusión.

Para facilitar la purificación y disminuir la producción de cuerpos de inclusión se usaron las proteínas de fusión SmbP y CusF3H+. Estas dos proteínas tienen afinidad a metales, por lo cual se puede usar IMAC para su purificación, además, son proteínas de fusión pequeñas (pesan alrededor de 10 kDa), por lo tanto, los rendimientos al momento de producir proteínas heterólogas son mayores. Con las dos proteínas de fusión se optó por el uso de Ni(II) ya que estudios anteriores muestran mejores resultados usando este metal [37, 39].

Los residuos de histidina presentes en las proteínas de fusión forman enlaces de coordinación con el Ni(II) con el cual está cargada la resina, por este motivo, se usó una solución amortiguadora de elución que contuviera 200 mM de imidazol. El imidazol compite por los sitios de coordinación presentes en el Ni(II) y eventualmente desplaza a la proteína de fusión y esta es eluida junto con la proteína de interés [55, 56].

En el caso de los péptidos antimicrobianos, además, del uso de las proteínas de fusión una estrategia que ha dado buenos resultados es la expresión de los péptidos en tándem. La expresión en tándem se basa en aumentar las copias del gen, al haber más copias los niveles de transcripción del gen aumentaran y esto dará como resultado el incremento de la expresión del péptido de interés [28].

Los tándems se separaron con un enlace flexible, los cuales tienen la finalidad de separar las repeticiones del péptido sin interferir con él, permitiendo que se plieguen de forma correcta y pueden ejercer su actividad antimicrobiana [57]. El enlace flexible que se empleó para separar las repeticiones de los péptidos fue (GGGS)<sub>3</sub>, el cual es uno de los enlaces flexibles más usados y ha sido empleado con anterioridad, tanto para expresar péptidos antimicrobianos [58], como algunas otras proteínas de interés [59–61]. Este enlace flexible está compuesto por los aminoácidos glicina y serina, los cuales son aminoácidos con estructuras sencillas por lo cual no interfieren con el péptido de interés, en adición, la serina le confiere estabilidad en soluciones acuosas y puede mejorar la solubilidad [62].



Después de obtener las construcciones se hicieron las expresiones a pequeña escala. La Figura 20 muestra la expresión a pequeña escala de GM-CSF. En los carriles 3, 4 y 5 se puede observar una banda alrededor de los 29 kDa la cual no está presente en el control (carril 2). Esta banda está en el peso esperado del GM-CSF.

Después de la expresión se realizó la purificación de PelB-SmbP-GM\_CSF usando la resina Profinity™ (ver Figura 23). En las fracciones de elución (carriles 6, 7 y 8) se puede ver la banda que corresponde al GM-CSF, sin embargo, es necesario optimizar tanto el proceso de expresión como el de purificación para poder obtener mejores resultados.

Después de la expresión de GM-CSF se continuó trabajando con la eritropoyetina. Generalmente cuando se produce eritropoyetina en *E. coli* es expresada como cuerpos de inclusión y en forma no glicosilada. Narhi *et al.* (2001) demostraron que las glicosilaciones presentes en la eritropoyetina incrementan su estabilidad y solubilidad [41], sin embargo, Jeong *et al.* (2014) fueron capaces de expresar eritropoyetina soluble en el citoplasma de *E.coli* usando MBP como proteína de fusión [8].

Basándonos en el trabajo de Jeong *et al.* (2014) decidimos producir eritropoyetina usando nuestras proteínas de fusión.

Se realizaron las expresiones piloto de las cuatro construcciones de la eritropoyetina, esto, con la finalidad de observar si la bacteria era capaz de producirla.

Al visualizar la expresión piloto mediante electroforesis de gel de poliacrilamida se observó que las cuatro construcciones presentaban una banda alrededor de los 30 kDa (Figura 19 carriles 4, 6, 10 y 12), si se compara con los controles (Figura 19 carriles 2 y 8) se puede observar que esta banda no se encuentra presente. Esta nueva banda coincide con el peso esperado de las construcciones el cual es alrededor de 29 kDa, esto se obtiene al sumar el peso de la proteína de fusión utilizada (tanto SmbP como CusF3H+ tienen un peso aproximado de 10 kDa) más la eritropoyetina (la cual tiene un peso aproximado de 19 kDa).

Cuando escalamos el proceso a 1 L de medio de cultivo observamos que la proteína era producida casi en su totalidad como cuerpos de inclusión.

Usando nuestras proteínas de fusión hemos sido capaces de expresar diversas proteínas de interés anteriormente como GFP, RFP, hGH, GCSF y GM-CSF, sin embargo, en el caso de la eritropoyetina no fueron capaces de producirla de forma soluble, creemos que esto se debe principalmente a la falta de glicosilaciones en la proteína.

Después de la producción de las proteínas se expresaron los péptidos antimicrobianos. Primero se llevaron a cabo las expresiones a pequeña escala de las construcciones del MP1106 y MP1106 tándem.

Al visualizar las expresiones mediante Tricina SDS-PAGE se observaron bandas alrededor de los 15 kDa en los carriles 2, 3, 4 y 5 (ver Figura 21), si se compara con el control (Figura 21 carril 10) se puede observar que esta banda

no se encuentra presente en el control. Esta nueva banda coincide con el peso esperado de las construcciones el cual es alrededor de 15.5 kDa, este peso se obtiene al sumar el peso de la proteína de fusión utilizada (tanto SmbP como CusF3H+ tienen un peso aproximado de 10 kDa) más el MP1106 (el cual tiene un peso aproximado de 5.5 kD).

También se hicieron las expresiones a pequeña escala de LL-37 y LL-37 tándem (ver Figura 22). En los carriles 3, 4, 5 y 6 se puede observar una banda alrededor de los 15 kDa la cual no está presente en el control (Figura 22 carril 10). Esta banda está en el peso esperado del LL-37 (peso aproximado 5.5 kDa) más la proteína de fusión (CusF3H+ o SmbP).

En las expresiones a pequeña escala no se lograron apreciar las bandas de las construcciones en tándem, esto puede ser por varios motivos. El primero es que el péptido no se haya plegado de manera correcta, formando así cuerpos de inclusión los cuales no pueden ser visualizados en las fracciones solubles, la otra opción involucra a la naturaleza de MP1106 y LL-37, estos péptidos poseen una alta carga positiva, por lo tanto, tienen mayor posibilidad de interactuar con ácidos nucleicos al ser expresados en tándem, estas interacciones podrían interferir con la traducción o la transcripción, disminuyendo o acabando por completo con la producción del péptido [63].

Después de observar que con algunas construcciones los péptidos se producían de manera satisfactoria, se seleccionaron las construcciones (1 por cada péptido) que se observó que producían una mayor cantidad de péptido para hacer el escalamiento a un litro de medio de cultivo. Las construcciones

seleccionadas para la expresión a 1 L fueron SmbP\_MP1106 y SmbP\_LL-37. Después de la expresión los péptidos obtenidos se purificaron usando el sistema automatizado ÄKTA prime plus, las fracciones obtenidas se observaron en un gel de Tricina SDS-PAGE y la pureza se calculó mediante densitometría usando el software ImageJ. Tanto para SmbP\_MP1106 como para SmbP\_LL-37 la pureza obtenida fue de ~90%.

En la Figura 24 podemos ver la expresión a 1 L de MP1106, en los carriles 4-8 se observan las fracciones de elución y la banda perteneciente a SmbP\_MP1106 alrededor de los 15 kDa.

En la Figura 25 podemos observar la expresión a 1 L de LL-37, en los carriles 4-9 se pueden apreciar las fracciones de elución y la banda perteneciente a SmbP\_MP1106 alrededor de los 15 kDa.

Como se ve en los geles los dos péptidos antimicrobianos se expresan de forma soluble cuando el proceso se escala a 1 L de medio de cultivo.

Para el caso de LL-37, diferentes proteínas de fusión han sido usadas para su producción: CBM3 [64], *Small Ubiquitin-like modifier* (SUMO) [65], GST [49], THX [50, 66, 67] y THX-SUMO [51].

Todos los sistemas de expresión usados con anterioridad involucran un método de purificación más complejo que el nuestro. Un proceso de purificación con múltiples pasos incrementa el tiempo y los costos de producción y dificulta el proceso de escalamiento.

De los sistemas de expresión antes mencionados el que usa GST como proteína de fusión es el que posee un proceso de purificación más simple, sin embargo, la producción final fue tan solo de 0.3 mg de LL-37 por litro de cultivo con una pureza >95%. Esto nos indica que GST es incapaz de producir grandes cantidades de LL-37 soluble, aunado a su gran tamaño podríamos decir que no es un candidato ideal para producir LL-37 [49].

La mayor producción de LL-37 en *E. coli* se logró usando THX como proteína de fusión, logrando producir 4.3 mg/L con una pureza >95%; sin embargo, esta metodología involucra tres pasos de purificación y el uso de Tritón X-100 en el proceso de lisis [50]. En nuestro trabajo, se produjeron 3.6 mg/L de SmbP\_LL-37 con una pureza del 90%, de los cuales 1.1 mg corresponden a LL-37 libre, esta producción es comparable con algunos de los protocolos usados con anterioridad sin necesidad de detergentes ni de ningún otro material particular. Cabe destacar que, si bien la pureza nuestro péptido es ligeramente menor que las reportadas con anterioridad nuestra metodología involucra solamente un paso de purificación, en caso de ser requerido un grado mayor de pureza se puede agregar un paso de purificación adicional. Estudios anteriores demuestran que mediante cromatografía de exclusión por tamaño o HPLC se puede obtener una pureza superior al 95% [51, 66].

En cuanto MP1106, este trabajo es la primera vez que se produce en un sistema procariota, ya que anteriormente solo se ha producido en la levadura *Pichia pastoris*. Nuestro sistema de expresión fue capaz de producir 4.7 mg/L de SmbP\_LL-37, de los cuales 1.4 mg corresponden a MP1106 libre. Si bien la

producción final es significativamente menor que cuando se produce en *Pichia pastoris* (831 mg/L) las condiciones de producción fueron muy diferentes, ya que se utilizó un cultivo *Fed-batch* en un bioreactor de 5 L y un tiempo de fermentación de 120 h [27].

Una vez obtenidos los péptidos recombinantes libres se realizaron las pruebas de actividad antimicrobiana. Se seleccionaron *S. aureus* y *E. coli* para probar la actividad ya que son bacterias de importancia clínica [68, 69].

Normalmente las proteínas de fusión son removidas porque interfieren con la actividad biológica de los péptidos, sin embargo, estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que nuestras proteínas de fusión no inhiben la actividad antimicrobiana en su totalidad [70]. Por este motivo se decidió probar la actividad antimicrobiana de SmbP\_MP1106 y SmbP\_LL-37.

Como también queríamos probar la actividad de MP1106 y LL-37 libres los péptidos recombinantes fueron digeridos con enteroquinasa. La Figura 27 carril 3 muestra SmbP\_MP1106 después del corte con enteroquinasa. Se puede observar que el corte se realizó casi en su totalidad, de igual forma, la Figura 28 carril 3 muestra SmbP\_LL-37 después del corte con enteroquinasa, consistente con reportes anteriores, el corte fue incompleto, probablemente debido a que LL-37 tiende a agregarse, lo que hace que el sitio de corte sea menos accesible [50, 71]. Después de los cortes probamos la actividad antimicrobiana de MP1106 y LL-37 libres sin purificación adicional, como una mezcla con SmbP libre, la enteroquinasa mínima utilizada y los restos del péptido recombinante que no fueron cortados, esperando que la actividad aumentara ahora que los péptidos

no estaban unidos a SmbP, cabe destacar que tanto SmbP como la enteroquinasa no presentan actividad antimicrobiana [70].

La Figuras 29 muestra los resultados de las pruebas de actividad antimicrobiana de SmbP\_MP1106 y LL37-libre, solo se muestra la gráfica para *S. aureus* ya que no presentó actividad contra *E. coli*, este resultado concuerda con lo esperado al ser MP1106 derivado de la plectasina la cual como ya se había mencionado con anterioridad posee una alta selectividad contra bacterias Gram-positivas.

Para SmbP\_LL-37 y LL-37 libre la Figura 30 muestra los resultados de la actividad contra ambas bacterias ya que estudios anteriores han demostrado que LL-37 posee actividad de amplio espectro [24].

En ambos casos después de la digestión con enteroquinasa la actividad aumento de forma drástica. Estos resultados eran de esperarse, ya que si bien SmbP no inhibe en su totalidad la actividad si impide que los péptidos antimicrobianos ejerzan su acción por completo.

MP1106 libre fue capaz de inhibir el crecimiento de *S. aureus* en un ~78% a una concentración de 50  $\mu$ M. Cao *et al* obtuvieron un efecto similar, pero con una concentración 500 veces menor, no se sabe con exactitud a que se debe este fenómeno por lo que investigación adicional es necesaria.

LL-37 libre fue capaz de inhibir el crecimiento de *S. aureus* en un ~69% y el de *E. coli* en un 64% a una concentración de 50  $\mu$ M. Estos resultados son similares a los obtenidos con anterioridad, aunque ligeramente menores. Esto

podiera deberse a que probamos la actividad de LL-37 en un ambiente con alto contenido de sal (NaCl 500 mM), a diferencia de los otros estudios donde no había presencia de NaCl [50, 51, 64]. Una de las principales preocupaciones del uso de AMPs como terapia es la incapacidad para ejercer su actividad en ambientes con alto contenido de sales [72]. Algunos estudios han demostrado que la actividad de LL-37 se ve reducida en presencia de NaCl [73–75].



## **CAPÍTULO 7**

### **7. CONCLUSIONES**

- 1.- Se obtuvieron 2 construcciones de GM-CSF, insertando el gen que codifica para el GM-CSF en los plásmidos pET30a-SmbP y pET30a-CusF3H+.
- 2.- Se obtuvieron 4 construcciones de la eritropoyetina, insertando el gen que codifica para la eritropoyetina (nativo o modificado) en los plásmidos pET30a-SmbP y pET30a-CusF3H+.
- 3.- Se obtuvieron 4 construcciones de LL-37, insertando el gen que codifica para el LL-37 (nativo o en tándem) en los plásmidos pET30a-SmbP y pET30a-CusF3H+.
- 4.- Se obtuvieron 4 construcciones de MP1106, insertando el gen que codifica para el MP1106 (nativo o en tándem) en los plásmidos pET30a-SmbP y pET30a-CusF3H+.
- 5.- Se realizaron las expresiones a pequeña escala de las 14 construcciones, y se evaluó la presencia de los péptidos mediante SDS-PAGE observando las bandas correspondientes en el peso esperado.

6.- Tanto la eritropoyetina nativa como la modificada se produjeron como cuerpos de inclusión.

7.- Utilizando la técnica de IMAC con iones Ni(II) se purificó SmbP\_GM-CSF, SmbP-MP1106 y SmbP\_LL-37.

8.- GM-CSF, MP1106 y LL-37 se produjeron de forma soluble en el citoplasma de *E. coli*.

9.- Se obtuvieron 4.7 mg de SmbP\_MP1106 por litro de cultivo de los cuales 1.4 corresponden a MP1106.

10.- Se obtuvieron 3.6 mg de SmbP\_LL-37 por litro de cultivo de los cuales 1.1 corresponden a LL-37.

11.- SmbP\_MP1106 es capaz disminuir el crecimiento de *S. aureus* (ATCC 25923) en un ~38 %. Después del corte con enteroquinasa la actividad aumenta hasta un ~78%.

12.- MP1106 no posee actividad antimicrobiana contra *E. coli* (ATCC 25922).

13.- SmbP\_LL-37 es capaz disminuir el crecimiento de *S. aureus* (ATCC 25923) en un ~29 %. Después del corte con enteroquinasa la actividad aumenta hasta un ~69%.

14.- SmbP\_LL-37 es capaz disminuir el crecimiento de *E. coli* (ATCC 25922) en un ~29 %. Después del corte con enteroquinasa la actividad aumenta hasta un ~64%.

## CAPÍTULO 8

### 9. SEGURIDAD EN EL TRABAJO DE DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

La disposición de residuos que se generaron durante el presente proyecto fueron gestionados de acuerdo a los lineamientos establecidos por el Departamento de Medio Ambiente y Seguridad de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL.

Los residuos se dispusieron como se muestra en la siguiente tabla

<b>Colector</b>	<b>Residuo generado</b>
Colector A (Soluciones Salinas de pH 6-8, sales, ácidos y bases orgánicas)	→ Solución amortiguadora TAE (Tris, ácido acético, EDTA) → TFB1 (RbCl, CaCl <sub>2</sub> , MnCl <sub>2</sub> , Glicerol) → Solución amortiguadora TGS (Tris, Glicina, SDS) → Solución amortiguadora Tricina (Tricina, Tris-HCl, SDS) → Solución amortiguadora de equilibrio (Tris-HCl, NaCl) Solución amortiguadora de elución (Tris-HCl, NaCl, Imidazol)
Colector G (Combinaciones orgánicas sólidas)	→ Agarosa → Poliacrilamida
Colorantes y lugol	→ Azul de Coomassie

## REFERENCIAS

1. Overton TW. Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discov Today*. 2014;19:590–601. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2013.11.008>.
2. Murray JE, Laurieri N, Delgoda R. Chapter 24 - Proteins. In: Badal S, Delgoda R, editors. *Pharmacognosy*. Boston: Academic Press; 2017. p. 477–94. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00024-X>.
3. Jozala AF, Geraldles DC, Tundisi LL, Feitosa V de A, Breyer CA, Cardoso SL, et al. Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. *Brazilian J Microbiol*. 2016;47:51–63. doi:10.1016/j.bjm.2016.10.007.
4. Dao LN, Lippe B, Laird M. Pharmaceutical Biotechnology: Fundamentals and Applications. In: Crommelin ADJ, Sindelar DR, Meibohm B, editors. New York, NY: Springer New York; 2013. p. 285–98. doi:10.1007/978-1-4614-6486-0\_14.
5. GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators G 2015 D and II and P. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet (London, England)*. 2016;388:1545–602. doi:10.1016/S0140-6736(16)31678-6.
6. Freifeld AG, Kaul DR. 36 - Infection in the Patient with Cancer. In: Niederhuber JE, Armitage JO, Doroshow JH, Kastan MB, Tepper JE, editors. *Abeloff's Clinical Oncology (Fifth Edition)*. Fifth Edit. Philadelphia: Content Repository Only!; 2014. p. 562-580.e5. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-2865-7.00036-9>.
7. Yang Y, Zhou Y, Yu L, Li X, Shi X, Qin X, et al. A novel reporter gene assay for

Recombinant Human Erythropoietin (rHuEPO) pharmaceutical products. *J Pharm Biomed Anal.* 2014;100:316–21. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.08.003>.

8. Jeong T-H, Son Y-J, Ryu H-B, Koo B-K, Jeong S-M, Hoang P, et al. Soluble expression and partial purification of recombinant human erythropoietin from *E. coli*. *Protein Expr Purif.* 2014;95:211–8. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pep.2014.01.001>.

9. Cowper B, Li X, Yu L, Zhou Y, Fan WH, Rao CM. Comprehensive glycan analysis of twelve recombinant human erythropoietin preparations from manufacturers in China and Japan. *J Pharm Biomed Anal.* 2018;153:214–20. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.02.043>.

10. Thomson CA, Olson M, Jackson LM, Schrader JW. A Simplified Method for the Efficient Refolding and Purification of Recombinant Human GM-CSF. *PLoS One.* 2012;7:1–6. doi:[10.1371/journal.pone.0049891](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049891).

11. Wu F, Dai L, Geng L, Zhu H, Jin T. Practically feasible production of sustained-release microspheres of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF). *J Control Release.* 2017;259:195–202. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.04.004>.

12. Lei J, Sun L, Huang S, Zhu C, Li P, He J, et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *Am J Transl Res.* 2019;11:3919–31. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31396309>.

13. Moravej H, Moravej Z, Yazdanparast M, Heiat M, Mirhosseini A, Moosazadeh Moghaddam M, et al. Antimicrobial Peptides: Features, Action, and Their

Resistance Mechanisms in Bacteria. *Microb Drug Resist.* 2018;24:747–67. doi:10.1089/mdr.2017.0392.

14. Zhao X, Wu H, Lu H, Li G, Huang Q. LAMP: A Database Linking Antimicrobial Peptides. *PLoS One.* 2013;8:e66557. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066557>.

15. Semreen MH, El-Gamal MI, Abdin S, Alkhazraji H, Kamal L, Hammad S, et al. Recent updates of marine antimicrobial peptides. *Saudi Pharm J.* 2018;26:396–409. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.01.001>.

16. Mahlapuu M, Håkansson J, Ringstad L, Björn C. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016;6:194. doi:10.3389/fcimb.2016.00194.

17. Haney EF, Mansour SC, Hancock REW. Antimicrobial Peptides: An Introduction. In: Hansen PR, editor. *Antimicrobial Peptides: Methods and Protocols.* New York, NY: Springer New York; 2017. p. 3–22. doi:10.1007/978-1-4939-6737-7\_1.

18. Fjell CD, Hiss JA, Hancock REW, Schneider G. Designing antimicrobial peptides: Form follows function. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2012.

19. Wimley WC. Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS Chemical Biology.* 2010.

20. Ageitos JM, Sánchez-Pérez A, Calo-Mata P, Villa TG. Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochemical Pharmacology.* 2017.

21. Dürr UHN, Sudheendra US, Ramamoorthy A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2006;1758:1408–25. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.03.030>.
22. Xhindoli D, Pacor S, Benincasa M, Scocchi M, Gennaro R, Tossi A. The human cathelicidin LL-37 — A pore-forming antibacterial peptide and host-cell modulator. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2016;1858:546–66. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.11.003>.
23. Fabisiak A, Murawska N, Fichna J. LL-37: Cathelicidin-related antimicrobial peptide with pleiotropic activity. *Pharmacol Reports.* 2016;68:802–8. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pharep.2016.03.015>.
24. Vandamme D, Landuyt B, Luyten W, Schoofs L. A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. *Cell Immunol.* 2012;280:22–35.
25. Mygind PH, Fischer RL, Schnorr KM, Hansen MT, Sönksen CP, Ludvigsen S, et al. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature.* 2005;437:975–80. doi:10.1038/nature04051.
26. Schneider T, Kruse T, Wimmer R, Wiedemann I, Sass V, Pag U, et al. Plectasin, a fungal defensin, targets the bacterial cell wall precursor lipid II. *Science (80- ).* 2010;328:1168–72.
27. Cao X, Zhang Y, Mao R, Teng D, Wang X, Wang J. Design and recombination expression of a novel plectasin-derived peptide MP1106 and its properties against

*Staphylococcus aureus*. Appl Microbiol Biotechnol. 2015.

28. Deng T, Ge H, He H, Liu Y, Zhai C, Feng L, et al. The heterologous expression strategies of antimicrobial peptides in microbial systems. Protein Expr Purif. 2017;140:52–9. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.08.003>.

29. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. Front Microbiol. 2014;5:172. doi:10.3389/fmicb.2014.00172.

30. Berlec A, Štrukelj B. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. J Ind Microbiol Biotechnol. 2013;40:257–74. doi:10.1007/s10295-013-1235-0.

31. Mohamed N. Baeshen. Production of biopharmaceuticals in *E. coli*: current scenario and future perspectives. J microbiology Biotechnol. 2014;25:1–24.

32. Kaur J, Kumar A, Kaur J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. International Journal of Biological Macromolecules. 2017. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.08.080.

33. Becker J, Wittmann C. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for the heterologous production of high value molecules—a veteran at new shores. Curr Opin Biotechnol. 2016;42:178–88. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2016.05.004>.

34. Li Y. Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: A review. Protein Expr Purif. 2011.



35. Berger S, Lowe P, Tesar M. Fusion protein technologies for biopharmaceuticals: Applications and challenges: Editor Stefan R Schmidt. *MAbs*. 2015;7:456–60. doi:10.1080/19420862.2015.1019788.
36. Francis DM, Page R. Strategies to Optimize Protein Expression in *E. coli*. *Curr Protoc Protein Sci*. 2010;24:1–29.
37. Cantu-Bustos JE, Vargas-Cortez T, Morones-Ramirez JR, Balderas-Renteria I, Galbraith DW, McEvoy MM, et al. Expression and purification of recombinant proteins in *Escherichia coli* tagged with the metal-binding protein CusF. *Protein Expr Purif*. 2016;121:61–5.
38. Vargas-Cortez T, Morones-Ramirez JR, Balderas-Renteria I, Zarate X. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli* tagged with the fusion protein CusF3H+. *Protein Expr Purif*. 2017;132:44–9. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2017.01.006.
39. Vargas-Cortez T, Morones-Ramirez JR, Balderas-Renteria I, Zarate X. Expression and purification of recombinant proteins in *Escherichia coli* tagged with a small metal-binding protein from *Nitrosomonas europaea*. *Protein Expr Purif*. 2016.
40. da Cunha NB, Cobacho NB, Viana JFC, Lima LA, Sampaio KBO, Dohms SSM, et al. The next generation of antimicrobial peptides (AMPs) as molecular therapeutic tools for the treatment of diseases with social and economic impacts. *Drug Discovery Today*. 2017.
41. Narhi LO, Arakawa T, Aoki K, Wen J, Elliott S, Boone T, et al. Asn to Lys

mutations at three sites which are N-glycosylated in the mammalian protein decrease the aggregation of *Escherichia coli*-derived erythropoietin. *Protein Eng.* 2001;14:135–40.

42. Macmillan D, Bill RM, Sage KA, Fern D, Flitsch SL. Selective in vitro glycosylation of recombinant proteins: semi-synthesis of novel homogeneous glycoforms of human erythropoietin. *Chem Biol.* 2001;8:133–45. doi:[https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(00\)90065-6](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(00)90065-6).

43. Wang YJ, Liu YD, Chen J, Hao SJ, Hu T, Ma GH, et al. Efficient preparation and PEGylation of recombinant human non-glycosylated erythropoietin expressed as inclusion body in *E. coli*. *Int J Pharm.* 2010;386:156–64.

44. Grunina TM, Demidenko A V, Lyaschuk AM, Poponova MS, Galushkina ZM, Soboleva LA, et al. Recombinant human erythropoietin with additional processable protein domains: Purification of protein synthesized in *Escherichia coli* heterologous expression system. *Biochem.* 2017;82:1285–94. doi:10.1134/S0006297917110062.

45. Jazii FR, Karkhane AA, Yakhchali B, Fatemi SS, Deezagi A. A simplified purification procedure for recombinant human granulocyte macrophage-colony stimulating factor from periplasmic space of *Escherichia coli*. *J Chromatogr B.* 2007;856:214–21. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.06.013>.

46. Schwanke RC, Renard G, Chies JM, Campos MM, Junior ELB, Santos DS, et al. Molecular cloning, expression in *Escherichia coli* and production of bioactive homogeneous recombinant human granulocyte and macrophage colony

stimulating factor. *Int J Biol Macromol.* 2009;45:97–102.

47. Das KMP, Banerjee S, Shekhar N, Damodaran K, Nair R, Somani S, et al. Cloning, soluble expression and purification of high yield recombinant hGMCSF in *Escherichia coli*. *Int J Mol Sci.* 2011;12:2064–76.

48. Jiao J, Mao R, Wang X, Zhang Y, Teng D, Feng X, et al. GAP-initiated constitutive expression of a novel plectasin-derived peptide MP1106 by *Pichia pastoris* and its activity against *Streptococcus suis*. *Process Biochem.* 2015.

49. Moon JY, Henzler-Wildman KA, Ramamoorthy A. Expression and purification of a recombinant LL-37 from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2006;1758:1351–8.

50. Li Y. A novel protocol for the production of recombinant LL-37 expressed as a thioredoxin fusion protein. *Protein Expr Purif.* 2012;81:201–10.

51. Li Y. Production of human antimicrobial peptide LL-37 in *Escherichia coli* using a thioredoxin–SUMO dual fusion system. *Protein Expr Purif.* 2013.

52. Guo C, Diao H, Lian Y, Yu H, Gao H, Zhang Y, et al. Recombinant expression and characterization of an epididymis-specific antimicrobial peptide BIN1b/SPAG11E. *J Biotechnol.* 2009.

53. Al-Hawash AB, Zhang X, Ma F. Strategies of codon optimization for high-level heterologous protein expression in microbial expression systems. *Gene Reports.* 2017;9:46–53. doi:10.1016/j.genrep.2017.08.006.

54. Long X, Gou Y, Luo M, Zhang S, Zhang H, Bai L, et al. Soluble expression,

purification, and characterization of active recombinant human tissue plasminogen activator by auto-induction in *E. coli*. BMC Biotechnol. 2015.

55. Kimple ME, Brill AL, Pasker RL. Overview of Affinity Tags for Protein Purification. Curr Protoc Protein Sci. 2013;73:Unit-9.9. doi:10.1002/0471140864.ps0909s73.

56. Young CL, Britton ZT, Robinson AS. Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications. Biotechnol J. 2012;7:620–34. doi:10.1002/biot.201100155.

57. Reddy Chichili VP, Kumar V, Sivaraman J. Linkers in the structural biology of protein-protein interactions. Protein Science. 2013.

58. Lv LH, Luo XG, Ni M, Jing XL, Wang N, Jiang Y, et al. Independent and tandem expression of a novel antimicrobial peptides plectasin in *Escherichia coli*. In: Advanced Materials Research. 2012.

59. Bai Y, Shen WC. Improving the oral efficacy of recombinant granulocyte colony-stimulating factor and transferrin fusion protein by spacer optimization. Pharm Res. 2006.

60. Hu W, Li F, Yang X, Li Z, Xia H, Li G, et al. A flexible peptide linker enhances the immunoreactivity of two copies HBsAg preS1 (21-47) fusion protein. J Biotechnol. 2004.

61. Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotny J, Margolies MN, et al. Protein engineering of antibody binding sites: Recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. Proc Natl

Acad Sci U S A. 1988.

62. Chen X, Zaro JL, Shen WC. Fusion protein linkers: Property, design and functionality. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013.

63. Zhou Y, Cao W, Wang J, Ma Y, Wei D. Comparison of Expression of Monomeric and Multimeric Adenoregulin Genes in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Protein Pept Lett*. 2005.

64. Ramos R, Domingues L, Gama M. *Escherichia coli* expression and purification of LL37 fused to a family III carbohydrate-binding module from *Clostridium thermocellum*. *Protein Expr Purif*. 2010;71:1–7.

65. Bommarius B, Jenssen H, Elliott M, Kindrachuk J, Pasupuleti M, Gieren H, et al. Cost-effective expression and purification of antimicrobial and host defense peptides in *Escherichia coli*. *Peptides*. 2010;31:1957–65.

66. Li Y, Li X, Wang G. Cloning, expression, isotope labeling, and purification of human antimicrobial peptide LL-37 in *Escherichia coli* for NMR studies. *Protein Expr Purif*. 2006;47:498–505.

67. Li Y, Li X, Li H, Lockridge O, Wang G. A novel method for purifying recombinant human host defense cathelicidin LL-37 by utilizing its inherent property of aggregation. *Protein Expr Purif*. 2007;54:157–65.

68. Rasigade JP, Vandenesch F. *Staphylococcus aureus*: A pathogen with still unresolved issues. *Infect Genet Evol*. 2014;21:510–4.

69. Braz VS, Melchior K, Moreira CG. *Escherichia coli* as a Multifaceted

Pathogenic and Versatile Bacterium. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:793. doi:10.3389/fcimb.2020.548492.

70. Montfort-Gardeazabal JM, Balderas-Renteria I, Casillas-Vega NG, Zarate X. Expression and purification of the antimicrobial peptide Bin1b in *Escherichia coli* tagged with the fusion proteins CusF3H<sup>+</sup> and SmbP. *Protein Expr Purif.* 2021;178:105784.

71. Oren Z, Lerman JC, Gudmundsson GH, Agerberth B, Shai Y. Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochem J.* 1999;341 ( Pt 3 Pt 3:501–13. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10417311>.

72. Aoki W, Ueda M. Characterization of Antimicrobial Peptides toward the Development of Novel Antibiotics. *Pharmaceuticals (Basel).* 2013;6:1055–81. doi:10.3390/ph6081055.

73. Travis SM, Anderson NN, Forsyth WR, Espiritu C, Conway BD, Greenberg EP, et al. Bactericidal activity of mammalian cathelicidin-derived peptides. *Infect Immun.* 2000;68:2748–55. doi:10.1128/IAI.68.5.2748-2755.2000.

74. Turner J, Cho Y, Dinh NN, Waring AJ, Lehrer RI. Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42.

75. Cox DL, Sun Y, Liu H, Lehrer RI, Shafer WM. Susceptibility of *Treponema pallidum* to host-derived antimicrobial peptides. *Peptides.* 2003;24:1741–6.